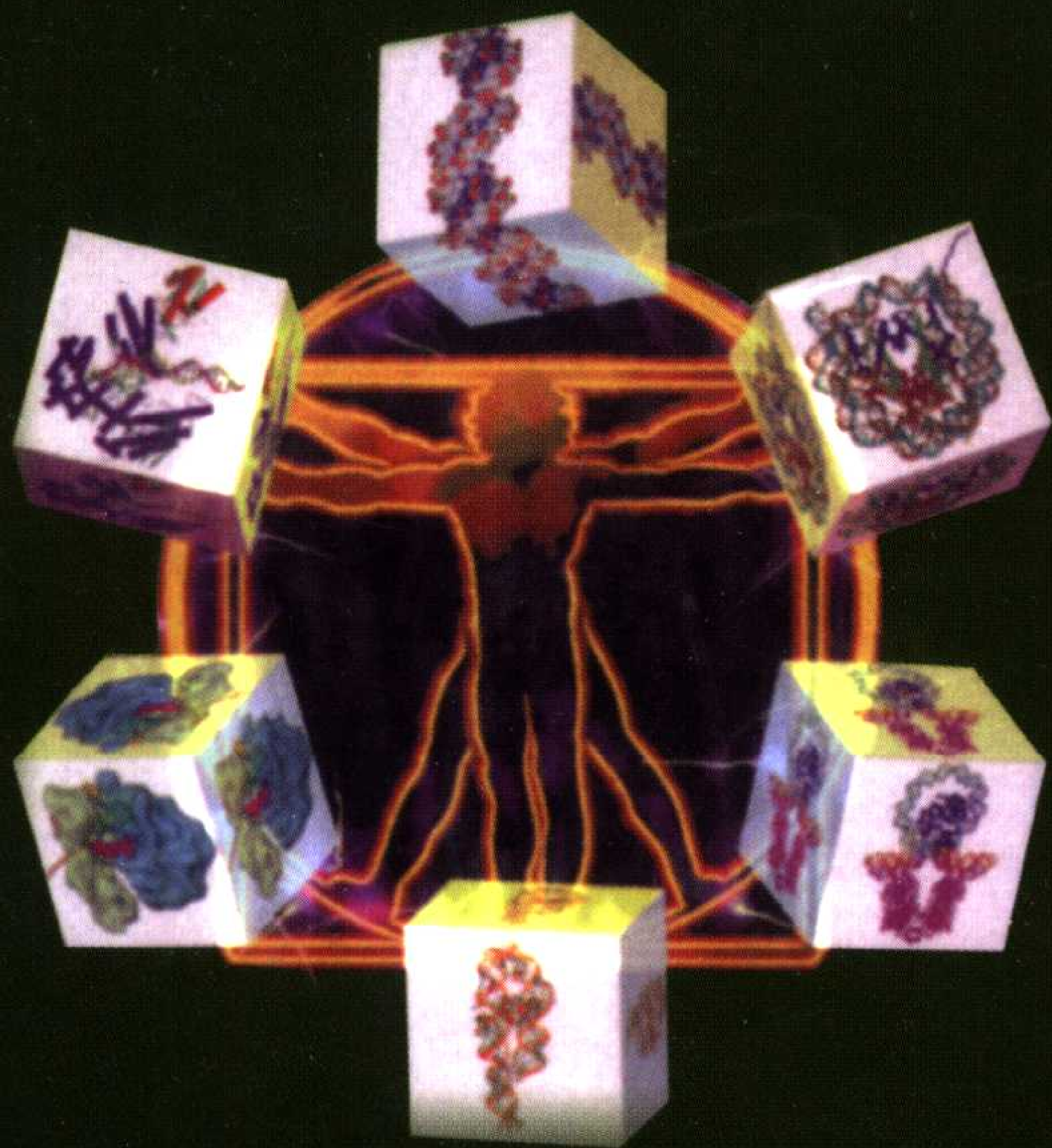
生命科学名著

D. 沃伊特
〔美〕J.G. 沃伊特 著
C.W.普拉特
朱德煦 郑昌学 主译



基础生物化学（上册）

FUNDAMENTALS OF BIOCHEMISTRY



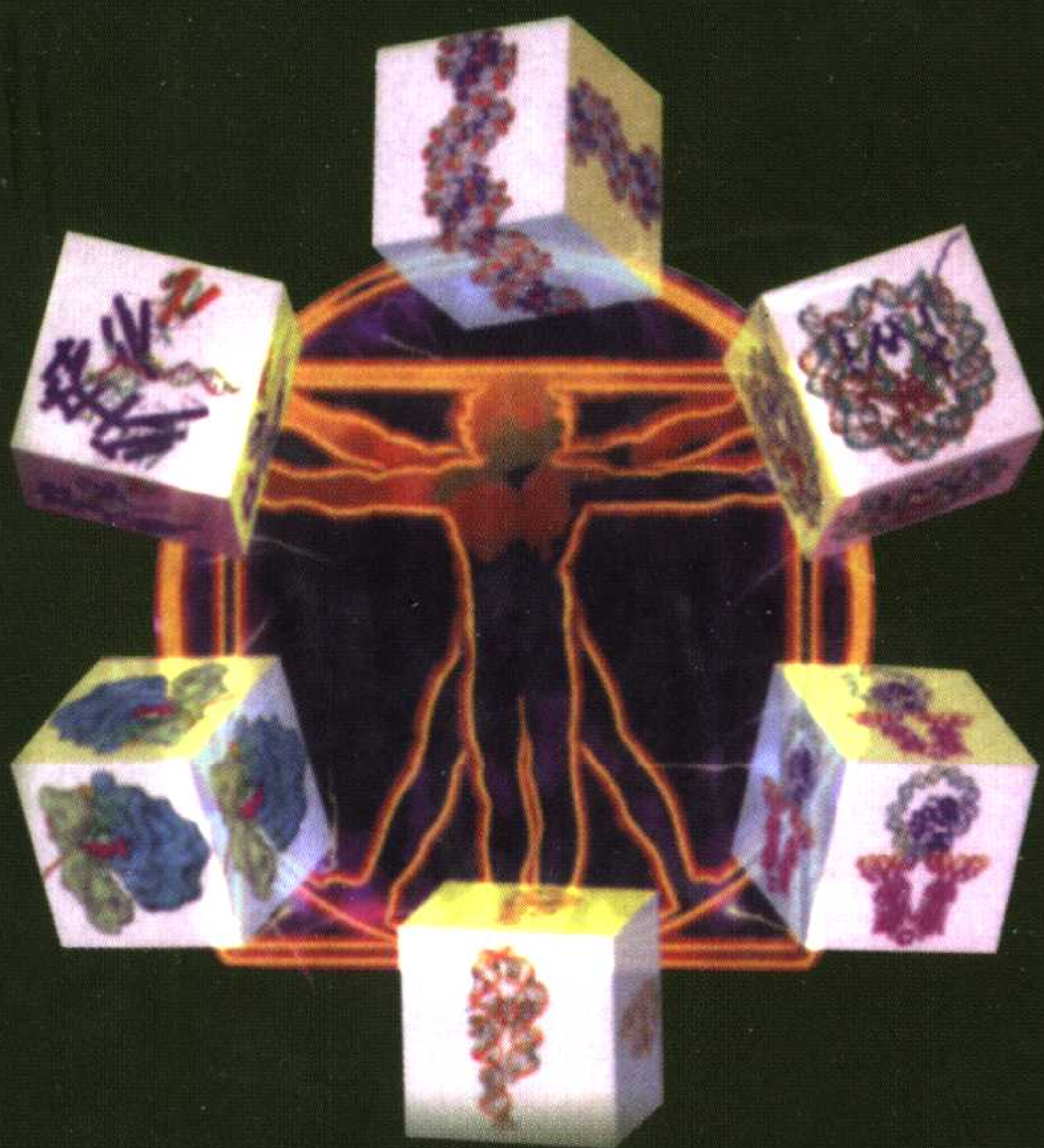
科学出版社
www.sciencep.com



生命科学名著

D. 沃伊特
〔美〕J.G. 沃伊特 著
C.W.普拉特

朱德煦 郑昌学 主译



基础生物化学（下册）

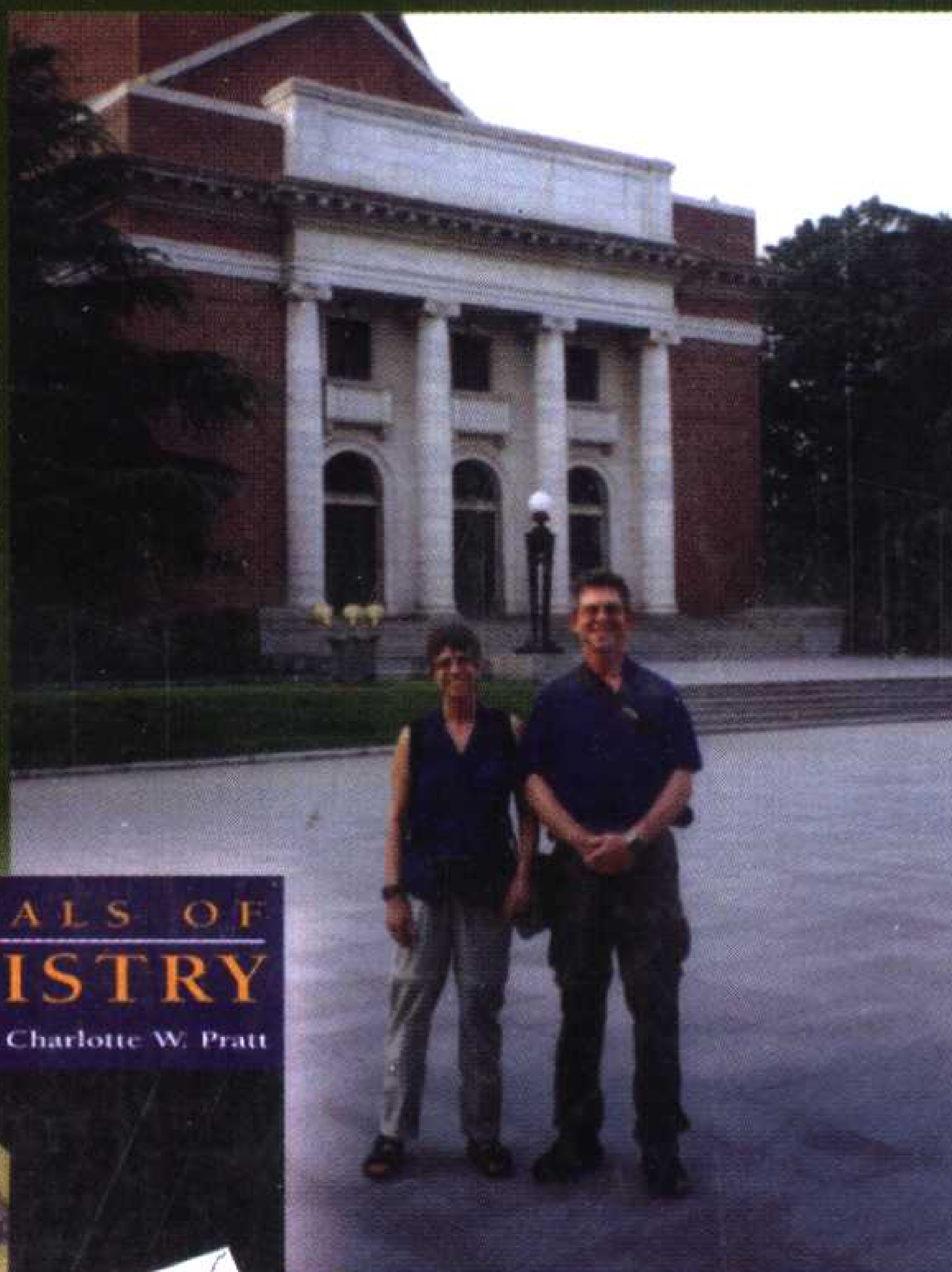
FUNDAMENTALS OF BIOCHEMISTRY

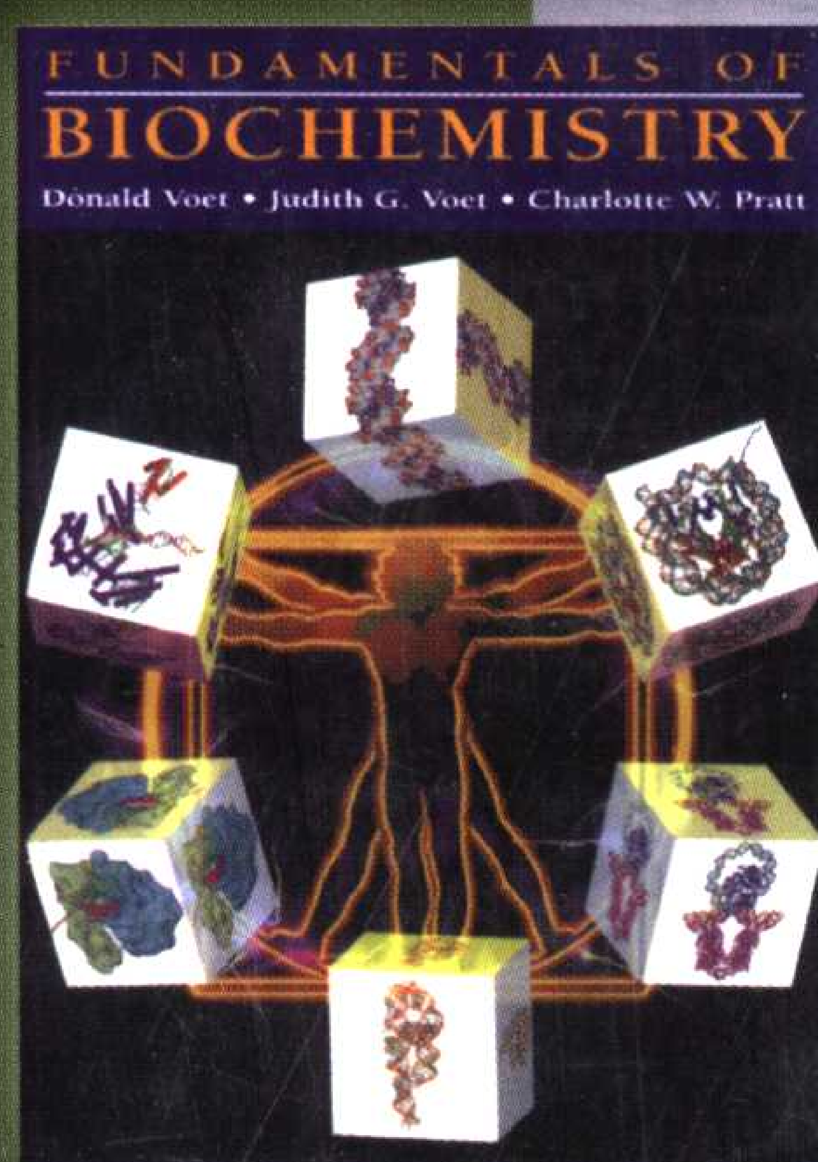


科学出版社
www.sciencep.com

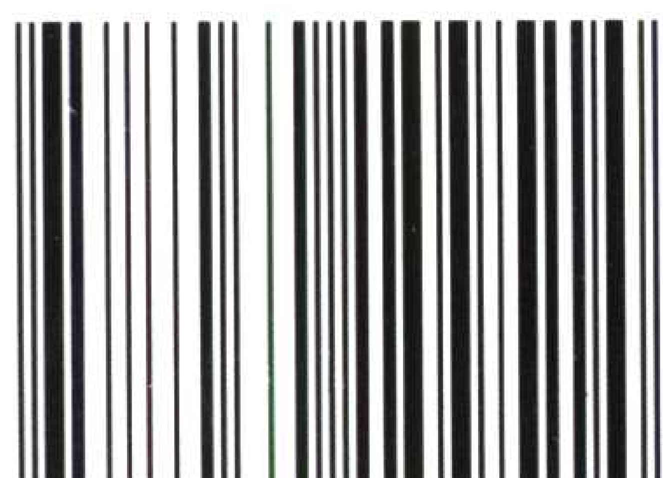


Q-1209.0101





沃伊特夫妇
2001年7月
在清华大学



生命科学编辑部
联系电话：010-64012501
http://www.lifescience.com.cn
e-mail:info@lifescience.com.cn

ISBN 7-03-010951-1
(上、下册) 定价：128.00元

基础生物化学（上册）

D. 沃伊特
〔美〕 J.G. 沃伊特　　著
C.W. 普拉特

朱德煦　郑昌学　主译

科学出版社
北京

基础生物化学（下册）

D. 沃伊特
〔美〕 J.G. 沃伊特 著
C.W. 普拉特

朱德煦 郑昌学 主译

科学出版社
北 京

图字:01-2000-0443

内 容 简 介

本书是著名的生物化学优秀教材 *Fundamentals of Biochemistry* 的中文版,由南京大学和清华大学具有丰富教学经验的教授主译。全书以适合教学的方式来组织内容,包括生物大分子、酶、代谢、基因表达等,重点介绍了生物大分子结构、化学机制、进化关系等,对生物化学历史的发展也作了适当的阐述,以提高学习兴趣,启发学生的创造性思维。每章后面附有小结、参考文献、关键词、学习思考题、练习题,有利于学生复习和巩固所学内容。书后还附有含全书彩图的光盘,使教学更形象直观。本书文字简明扼要,插图精美,主线明确,富有启发性。适合作为综合性大学生命科学领域的教师和高年级本科生以及科研人员参考。

图书在版编目(CIP)数据

基础生物化学/(美)沃伊特(Voet,D.)等著;朱德煦,郑昌学主译.—北京:科学出版社,2003.8
(生命科学名著)
ISBN 7-03-010951-1
Ⅰ.基… Ⅱ.①沃…②朱…③郑… Ⅲ.生物化学-教材; Ⅳ.Q5
中国版本图书馆 CIP 数据核字(2002)第 089658 号

责任编辑:王 静 庞在堂 谢灵玲 余和芬 陈欣然/责任校对:钟 洋
责任印制:刘士平/封面设计:槐寿明

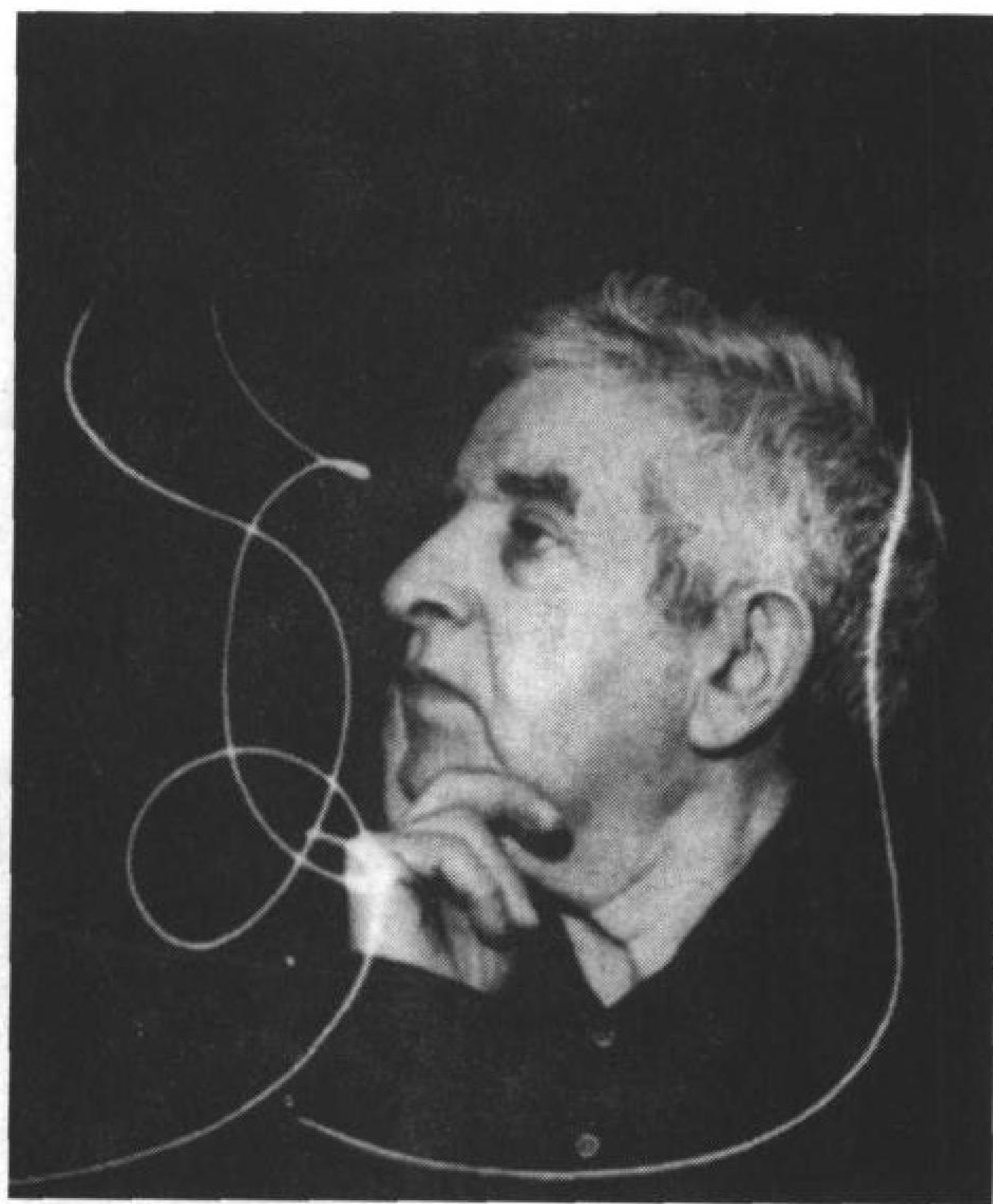
科学出版社 出版
北京东黄城根北街16号
邮政编码:100717
http://www.sciencep.com
源海印刷有限责任公司 印刷
科学出版社发行 各地新华书店经销
*
2003年8月第 一 版 开本:787×1092 1/16
2003年8月第一次印刷 印张:77 1/4
印数:1—3 000 字数:1 767 000

定价:128.00元(上、下册)

献　　给

艺术家、教师、朋友

Irving Geis



（蒙 Sandy Geis 慨允）

Fundamentals of Biochemistry
Donald Voet, Judith G. Voet, Charlotte W. Pratt

参译人员

主译:朱德煦　郑昌学

参译(按汉语拼音排序):

陈兰明　陈钧辉　蔡国平　段明星

江雪源　金以丰　刘祖同　刘　征

史景熙　王　进　王希成　易祖华

郑伟娟　张洪祖　张敏跃　周玉祥

中文版序

生物化学无疑是一个有巨大魅力和广泛用途的领域，它与我们自身的关系日益密切。人类的生活质量，特别是在医学和营养学方面，因为我们对生物化学的了解迅速增长而得到很大改善。的确，几乎过去的每一天都在报道着生物医学的新发现，而这些发现对人类是十分有益的。相关知识领域的进一步发展，将使我们在了解自然和控制我们命运的过程中获得更丰硕的成果，所以，对于从事生物医学事业的学生而言，精通生物化学具有极为重大的意义。

生物化学，正如其名，是一门将化学与生物学结合在一起的学科。它是千万个有才能和具有献身精神的科学家，为了了解我们称之为生命的一系列复杂化学反应的分子基础，历经了一个多世纪努力奋斗的结果。人类从事医学、农业、了解自身和其他生物的方法，已经起了巨大的变化。现在已经清楚，生命在分子尺度上具有同一性，这对上一代以前的生物学家是不可想像的。而且，生命的化学是一门实验化学家尚未开始去接近的复杂而精确的学科。因此在几乎所有的科学领域的教学中，生物化学都占有重要的地位。我们希望《基础生物化学》的中文版将使更多学生接触到生物化学这一学科，同时也希望这些知识使他们和其他人的生活丰富多彩。

Donald Voet

Donald Voet
Judith G. Voet
October 2, 2002
（清华大学　周玉祥　译）

Preface for the Chinese Translation of *Fundamentals of Biochemistry*

Biochemistry is a field of enormous fascination and usefulness, arising, no doubt, from our own self-interest. Human welfare, particularly its medical and nutritional aspects, has been vastly improved by our rapidly growing understanding of biochemistry. Indeed, scarcely a day passes without the report of a biomedical discovery that benefits a significant portion of humanity. Further advances in this expanding field of knowledge will almost certainly lead to even more spectacular gains in our ability to understand nature and to control our destinies. It is therefore of great importance that students embarking on a career in biomedical sciences be well versed in biochemistry.

Biochemistry, as its name indicates, brings together the subjects of chemistry and biology. It is the result of efforts by tens of thousands of talented and dedicated scientists over a period of more than a century to understand the molecular basis of the complicated series of chemical reactions that we call life. It has greatly changed the way medicine is practiced, the way agriculture is carried out, and the way we view ourselves and other living things. Life, it is now clear, has a unity on the molecular scale that biologists of only a generation ago could not imagine. Moreover, the chemistry of life has a sophistication and precision that laboratory chemists have not yet begun to approximate. Thus, biochemistry has numerous important lessons to teach nearly all scientific disciplines. It is therefore our hope that the Chinese translation of *Fundamentals of Biochemistry* will expose many students to the subject of Biochemistry and that this knowledge will make a difference in their lives and the lives of others.

Donald Voet

Donald Voet
Judith G. Voet
October 2, 2002

译 者 序

生命科学自进入分子水平以来,发展迅猛,新知识和新发现大量涌现。从事生命科学和医学的广大研究工作者、高校教师和学生很需要一本有一定广度、能反映本学科最新进展、论述清晰的生物化学教材。D. Voet 和 J. G. Voet 等所著的《基础生物化学》内容详实、取材适当、图文并茂,并附有启发性的练习题、思考题及题解。特别是本书适当论述了研究者对生物化学重要发现所用的方法、思路和线索,对启发学习者的兴趣,从中学到科学的思维方法很有帮助。原书的彩色图解极大地增加了本书的可读性,对理解生物分子的结构和生物过程很有帮助。由于成本的限制,中文版不得不忍痛割爱,采用了黑白图片,我们建议读者充分利用所附光盘观察图解,以补中文版的不足。

为了早日使本书的中文版和读者见面,每一章都由一位译者翻译,由朱德煦和郑昌学校订。虽然我们制定了"翻译规则",力求译文忠于原著,并在用词和语气上统一,但由于时间仓促和水平有限,错误在所难免,我们诚恳地希望读者给予批评指正。

南京大学　朱德煦
清华大学　郑昌学

前　言

只有成功地把我们的知识传授给别人时的喜悦才可以和攻克难关时的兴奋相比。作为教师，撰写本书的目的就是从学生的需求出发来介绍生物化学，因而我们精心组织，广泛应用图解，条理清晰地编写了本书。我们追求的并不是写一本百科全书，而是力求展示一本有一定广度，并论述清晰的生物化学教材。引导学生进入一个不断扩展的知识领域。没有其他方法可以代替一本精心制作、广泛联系并易于使用的教科书。

熟悉 Donald Voet 和 Judith G. Voet 编写的《生物化学》一书的读者会高兴地发现《基础生物化学》保留了前者的全部知识体系，去除了部分冗繁的细节。但《基础生物化学》并不是《生物化学》的简略本，而是一本具有自己的组织体系和格调的全新著作。《基础生物化学》和它的亲本一样，体现了生物化学应该具有的化学严谨性，重视生物分子的结构、化学机制和进化关系。本书力求传授充满智慧的生物化学历史，使读者了解解决生物化学难题所用的工具和方法，以及引发新发现的线索。我们也注意涵盖本学科的最新发展，特别是对人类的健康与疾病，因为很多学习生物化学的学生今后都会在这一领域寻求发展。最后，我们希望借本书表达我们对完美的生命的结构及其化学的赞赏和敬畏。

本书的结构

《基础生物化学》由 5 部分组成：

1. 两章导论，涉及生命的起源、进化、热力学简介、水的性质及酸-碱化学。
2. 8 章涉及生物分子的结构，包括核苷酸、核酸、氨基酸、蛋白质、糖、脂和生物膜。
3. 两章讨论酶学。
4. 10 章讨论新陈代谢，包括一章导论，总览代谢途径、高能化合物的热力学和氧化-还原反应。其中一章涉及哺乳动物的重要代谢途径的整合、不同器官的代谢特点，以及代谢调控。
5. 5 章论述核酸的生物化学，其中导论一章中有一节特别介绍 DNA 结合蛋白，论述催化和调控复制、转录及翻译有关的蛋白质。

我们对《基础生物化学》内容的组织，是根据我们的讲授方法来安排的，但我们也知道许多教师沿用不同的教学提纲，因此本书的章节被划分在不同的部分，使教师和学生易于确定某一特定主题的位置及相关主题间的联系。我们希望这种形式可以减轻那些“一略而过”但又担心丢失关键信息的读者的顾虑。

本书在第 1 章中就介绍了热力学，因为它是理解疏水作用(第 2 章)和蛋白质结构(第 6 章)所必需的。代谢反应的热力学则在第 13 章代谢导论中再次被回顾，在这一章中也讨论了氧化反应，而电化学的内容则推后到第 17 章(电子转移与氧化磷酸化)中讨论。

考虑到核苷酸和核酸在生物化学中处于中心地位，因此本书在第 3 章中就论述了这些物质。实际上蛋白质化学的每一领域都和其编码基因的克隆、测序、表达和突变有关。因此要理解怎样研究蛋白质，以及蛋白质又是如何揭示进化的历史，必须先了解核苷酸在生物化学中的作用。对于已经熟悉 DNA 和 RNA 的生物学功能的学生，可以把这一章作为复习。这一章的设置也是为了方便读者在后半部分详细论述核苷酸之前能较好地理解蛋白质的进化。这一章也介绍了核苷

酸，例如 ATP 在代谢中的重要作用。第 3 章的内容也可以放在授课的较后阶段讨论；或者在讲授了其他生物大分子后结合第 23 章的内容讲授。第 23 章介绍核酸结构的细节和核酸-蛋白质的相互作用。

讲解酶学的两章（第 11 章）和（第 12 章）放在分子结构和代谢有关章节之间，但也可以紧接在蛋白质结构（第 6 章）或蛋白质功能（第 7 章）之后讨论。酶的作用机制（第 11 章）被安排在酶动力学（第 12 章）之前论述，以便在介绍较抽象的反应动力学之前，使学生较易理解酶是如何工作的。

类似地，糖（第 8 章）、脂（第 9 章）和膜（第 10 章）可以安排在酶之后（第 11、12 章）与其他大分子（第 3～7 章）一并讲解，或与新陈代谢相关的章节结合讲解。

中心代谢途径均被详细论述（如糖酵解和柠檬酸循环），可使学生认识到单个酶如何催化反应，以及酶又是如何协同作用以完成复杂的生化过程的。代谢途径的调控也是中心问题，但并不是所有的代谢途径的调控都详加阐述，特别是对某些脂和氨基酸的生物合成途径的调控未加描述。而关键性酶反应，由于它们有令人感兴趣的化学和调控性质，因此被重点阐述。代谢途径的重点放在哺乳动物的新陈代谢上，其他生物类型的有趣的代谢变异也有论述。学生可将重点放在人类的健康和疾病上。

实际上，所有糖代谢的内容都包含在第 14、15 章中，没有其他内容的干扰，有利于学生更好地辨析相反代谢途径的特点（如葡萄糖和糖原的合成和分解）。专有一章（第 21 章）整合哺乳动物的新陈代谢，阐述器官间交互的代谢过程，例如 Cori 循环和糖尿病的发生，只在这一章中充分论述。

第 24～26 章以平行的方式论述了 DNA 的复制、转录和翻译，便于学生比较这些过程的起始、延伸以及终止的类同点。

第 27 章涉及各种调节机制，将它们集中论述，以避免在转录和翻译等有关章节中再列入这些选读性内容，有利于集中对基本途径的讲述。

教学法特点

本书构建了几个指导学生的特别之处，有利于他们关注基本原理和帮助他们学习。每章的开始都有一幅图，描绘出这一章的主要内容，每一章的内容都安排成**提纲形式**，以帮助学生理解不同主题间的关系。

生化过程、化合物、酶以及疾病的名称，在第一次出现时都用黑体字标示。每章的结尾均列出**关键词**，便于学生定义或解释最重要的生化术语。这些关键词和其他一些术语，在书末的**词汇表**中都有定义，便于参考。强调实验结论和主要生化原理的**关键语句**都以楷体标示。

重点讲述结构、功能和代谢的**关键图表**，都有突出标示，以备仔细研究学习。例如肌肉内产生力的机制（图 7-29）、丝氨酸蛋白酶的催化机制（图 11-26）、柠檬酸循环（图 16-2）和大肠杆菌核糖体中的延伸循环（图 26-28）。在第 13～21 章中的各**重点总览图**，有助于学生学习复杂的代谢过程。

本书的**图解**，包括各种类型的示图，其制作的出发点是便于从不同角度观察生物分子和生物过程。许多图解是由问题的发现者首创的。本书也复制了取自研究论文的图示、计算机制作的分子模型、电子显微图、线条图表和示意图。

选读性附加材料都被置于**框中**，以使正文减少枝节性材料。采用了三种线框，所有选读性材

料都和正文密切相关,还提供额外的信息和思考的基础。**生物化学焦点**,包括技术描述、解决生化问题的方法以及可能超出本文范围的高层次信息(如框 3-2, PCR 的应用;框 11-2, 催化性抗体;框 23-3, 病毒核酸的包装)。**生物化学相关内容**,用于更理论性的主题,以使学生能将生化知识和其他领域的学习结合起来(如框 15-1, 优化糖原结构;框 24-5, 为何 DNA 不含尿嘧啶)。**健康和疾病的生物化学**,包括介绍生物化学缺陷导致的疾病(如框 6-4, 与蛋白质折叠有关的疾病;框 20-2, 紫质症)。

每章均有该章主要内容的**小结**,以便快速回顾。一套**学习思考题**使学生明确该章的主题,并检验自己掌握的程度。例如要求学生描述 α 螺旋(第 6 章)的氢键结构、底物循环(第 14 章)的代谢优势,以及真核细胞三种 RNA 聚合酶的功能(第 25 章),问题的答案虽未明确给出,但在文中都可找到。

每一章还有至少 10 道引人深思的**练习题**,这些问题不是简单的常规练习,而是需要应用新掌握的知识。书后附有所有这些问题的详细解答。

计算题包括热力学、pH 值计算、酶动力学和氧化还原化学等方面的问题。

列出的一些**参考文献**,主要是综述性文章,而不是全面的参考书,列在每一章的后面,以便学生获取额外的信息。重要或具有历史意义的原文,也列入参考文献中。本书也指出(附网址)怎样使用互联网查询有关蛋白质和核酸的序列、分子结构、酶的分类和代谢途径的数据库。

书后附有词汇汇编,包括本书所用生化术语的定义。

补充资料

《基础生物化学》提供以下补充材料:

- 只读光盘,包含《基础生物化学》一书中的所有图解,可以用电脑化投影仪在课堂上投影,或制成透明片。
- 一个网站(http://www.wiley.com/college/voetfundamentals)包含补充资料,并可和其他站点链接。一套电脑评分测验,学生可以自己测试所掌握的知识,或由教师指定完成并评分。
- 为教师开设的电子邮件论坛。此项服务需预定,发一个电子邮件给 voetfundamentals@wiley.com,并在主题栏中标明“Subscribe”。

(南京大学 朱德煦 译)

致 谢

这本教科书是许多人无私奉献、辛勤努力的结晶，其中一些人要特别地指出：

Judith Allan 设计了本书的封面。Ellen Bari 引导并监督我们进行了 CD-ROM 和网站的开发。Irving Geis 给我们提供了出众的分子设计艺术并随时给我们以明智的建议。Laura Ierardi 将本书每一页中的课文、图和表巧妙地结合在一起。Suzanne Ingrao, 我们的出版经理，精细地安排了本书的出版。Barbara Heaney, 我们的策划编辑，协调全书艺术风格和编写计划，以便我们能埋头写作。Madehyn Lesure 设计了书的印刷体例，并提出有价值的建议。Cliff Mills, 我们的管理编辑，精巧地组织和管理了整个项目。Hilary Newman 和 Ramon Rivera-Moret 收集了书中的大量图片，并一直追踪它们。Connie Porks, 我们的文案编辑，对打印稿作了最终修饰并更正了大量书写和打字的错误。Sandra Russell 和 Pamela Kennedg Oborski 是我们在 Wiley 出版社的出版经理。Edward Starr 和 Ishaya Monokolt 协助了插图制作。

本书使用的许多蛋白质和核酸的原子坐标取自 Brockhaven 国家实验室的蛋白质数据库。我们利用 Mike Carson 的 RIBBONS、Anthony Nicholls、Kim Sbarp 和 Barry Honigi GRASP 及 BIOSYM 技术公司的 INSIGHTII 这些分子作图程序作出了蛋白质和核酸原子核型图，还有一些图是别人的馈赠。他们也是用这些程序或 Thomas Ferrin、Conrad Huang、Laurie Jarvis 和 Robert Langridge 的 MIDAS 程序、Per Kraulis 的 MOLSCRIPT 程序及 Alwyn Jones 的程序作出的。

与本书一起提供的 CD-ROM 中的互动计算机图解是 Chime™ 影像或 Kinemages。基于 Roger Sayle 的 RasMol 程序的 Chemscape Chime™ 由 MDL 信息系统公司开发并为大众使用。用 David C. Richardson 馈赠和编写的 MAGE 程序演示 Kinemages, 他也编写并提供 PREKIN 程序。作者利用该程序作出 Kinemages。

我还要特别感谢审阅此书的下列同仁们：

Marjorie A. Bates
University of California at Los Angeles
Charles E. Bowen
California Polytechnic University
Caroline Breitenberger
The Ohio State University
Scott Champney
East Tennessee State University
Kathleen Cornely
Providence College
Bonnie Diehl
The Johns Hopkins University
Jacquelyn Fetrow
University of Albany
Jeffrey A. Frich
Illinois Wesleyan University
Michael E. Friedman
Auburn University
Arno L. Greenleaf
Duke University
Michael D. Griswold
Washington State University
James Hageman
New Mexico State University
Lowell P. Hager
University of Illinois at Urbana-Champaign
LaRhee Henderson
Drake University

Diane W. Husic
East Stroudsburg University
Larry L. Jackson
Montana State University
Jason D. Kahn
University of Maryland at College Park
Barrie Kitto
University of Texas
Anita S. Klein
University of New Hampshire
Paul C. Kline
Middle Tennessee State University
W. E. Kurtin
Trinity Untversity
Robley J. Light
Florida State University
Robert D. Lynch
University of Massachusetts-Lowell
Dave Mascotti
John Carroll University
Gary E. Means
The Ohio State University
Laura Mitchell
Saint Joseph's University
Tim Osborne
University of California at Irvine
G. R. Parslow
University of Melbourne
Allen T. Phillips
Pennsylvania State University
Leight Plesniak
University of San Diego
Stephan Quirk
Georgia Institute of Technology
Raghu Sarma
State University of New York at Stony Brook
Bryan Spangelo
University of Nevada at Las Vegas
Gary Spedding
Butler University
Pam Stacks
San Jose State University
Scott Taylor
University of Toronto
David C. Teller
University of Washington
Steven B. Vik
Southern Methodist University
Jubran M. Wakim
Middle Tennessee State University
Joseph T. Warden
Rensselaer Polytechnic Institute
William Widger
University of Houston
Bruce Wightman
Muhlenberg College
Kenneth O. Willeford
Mississippi State University
Robert P. Wilson
Mississippi State University
Adele Wolfson
Wellesley College
Cathy Yang
Rowan University
Leon Yengoyan
San Jose State University
Ryland F. Young
Texas A & M University

最后，我们还要感谢 Joel Sussman, Michal Harel 和他们以色列魏斯曼科学研究所的同仁们。感谢他们在我们写作本书时对我们表现的无限热情和与其富有启发的交谈。也要感谢 Yeda 计算机公司，感谢他们慷慨地提供了 Macintosh 计算机，供我们在魏斯曼科学研究所时使用。

(清华大学 郑昌学 译)

致同学们

同学们，你们将开始“生命化学”这一发现之旅。在过去一个多世纪中，由成千上万个研究者不懈的努力和巧妙的工作铸成的这一知识宝库，已对医学、农业及我们观察自己和周围世界的方法产生了巨大的影响。这是一部壮丽并让人敬畏的史诗。它将使那些学习它的人们对它产生终生的热爱和迷恋。

在你们开始这一漫游之前，我们有几句忠告：你将要面对的生物化学术语丰富得近乎是一门外语。书的许多章节前后承接，因此你们应当将学习与课程讲授紧密结合，这一点十分重要。章末的材料，包括学习思考题和练习题，是为你们掌握和应用理论而设计的。你们应当在看答案之前，独立完成它们。此外，还要根据参考文献，在互联网上和图书馆中，利用补充材料使自己获得额外的信息。

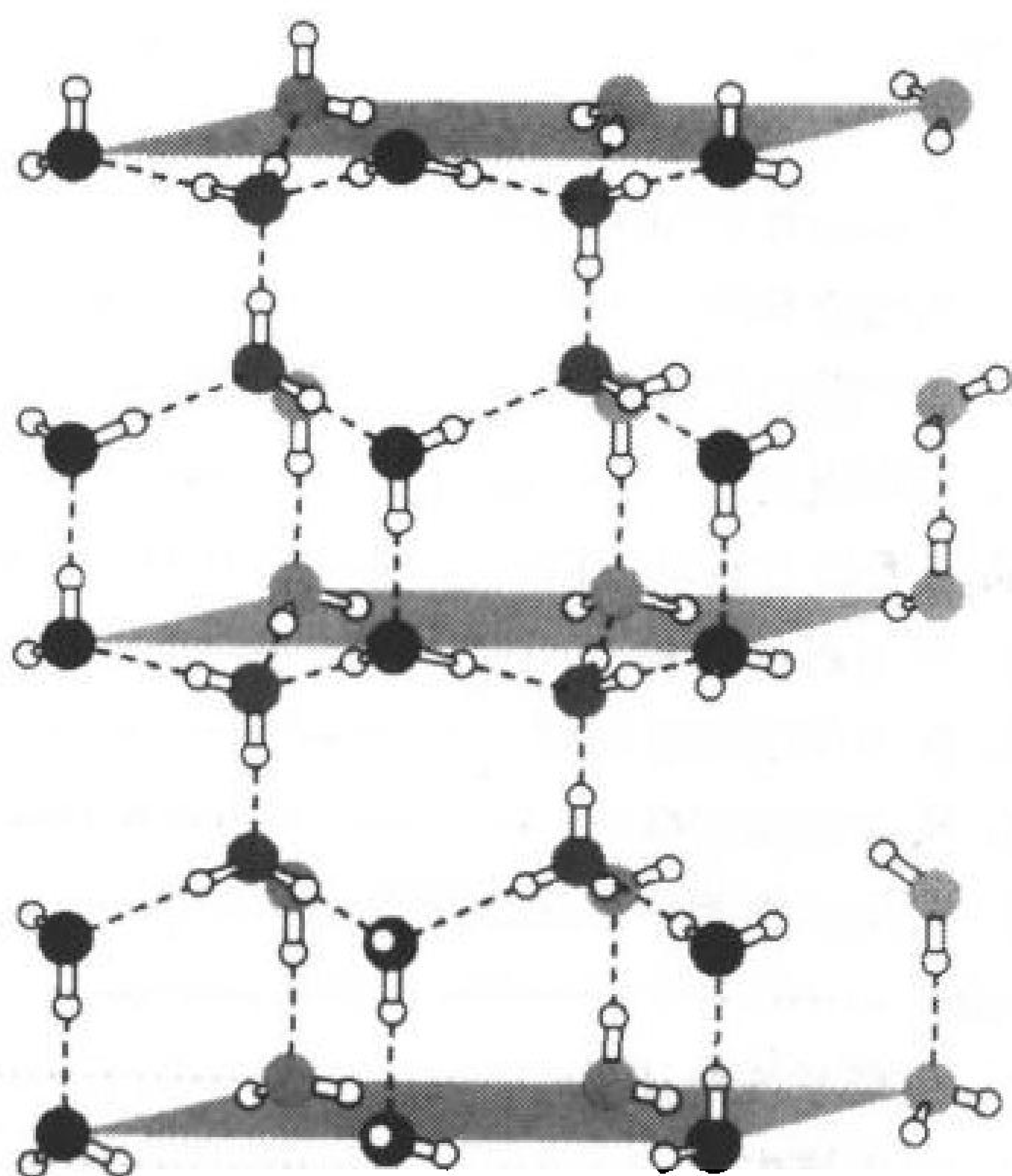
生物化学是一门极具挑战性的科学，它需要勤奋和智慧。多一份辛劳必将多一份收获。

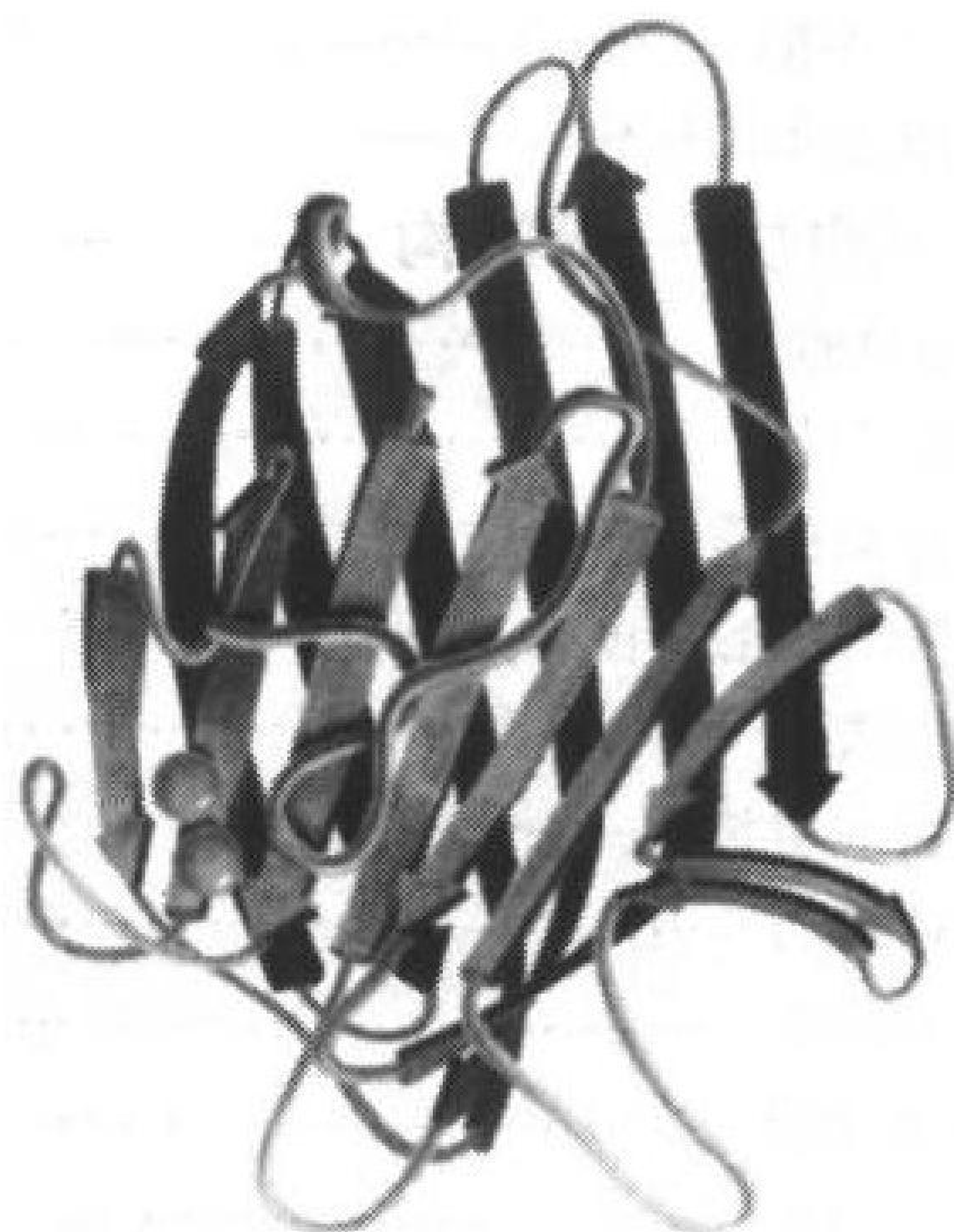
同学们，迎接这一挑战吧！开始一程激动人心的漫游吧！祝你们旅途愉快！

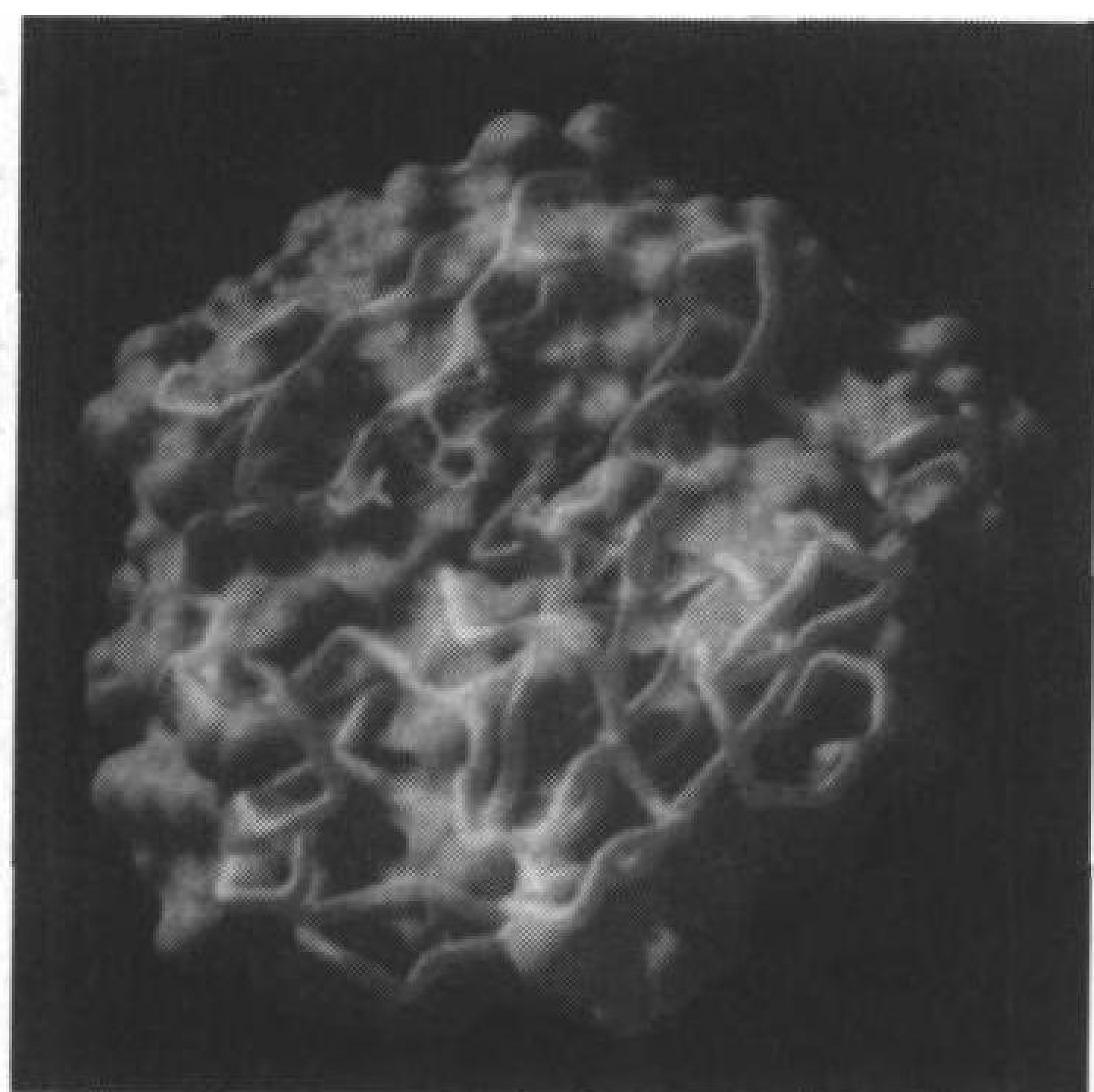
朱德煦　郑昌学

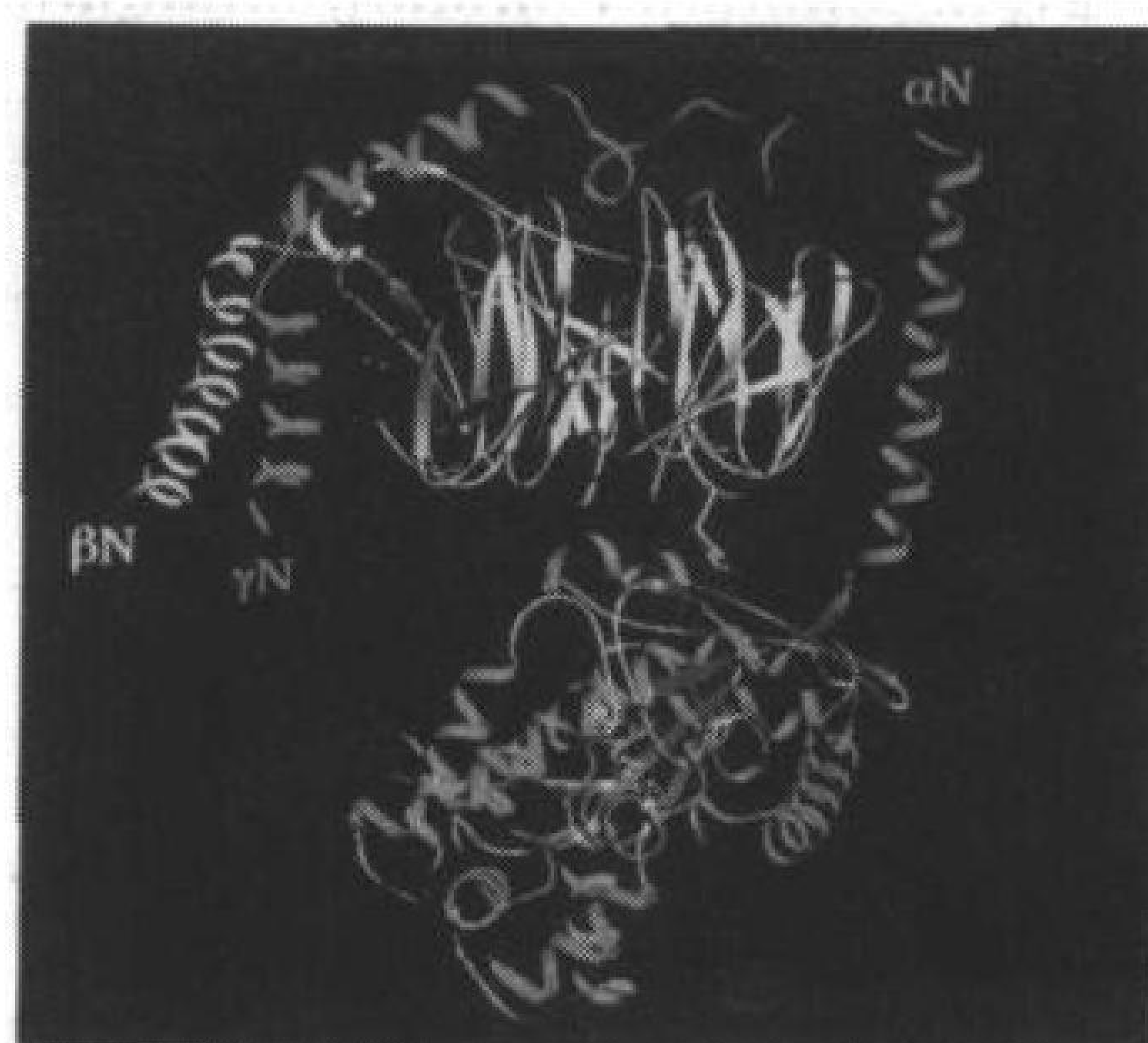
简　　目

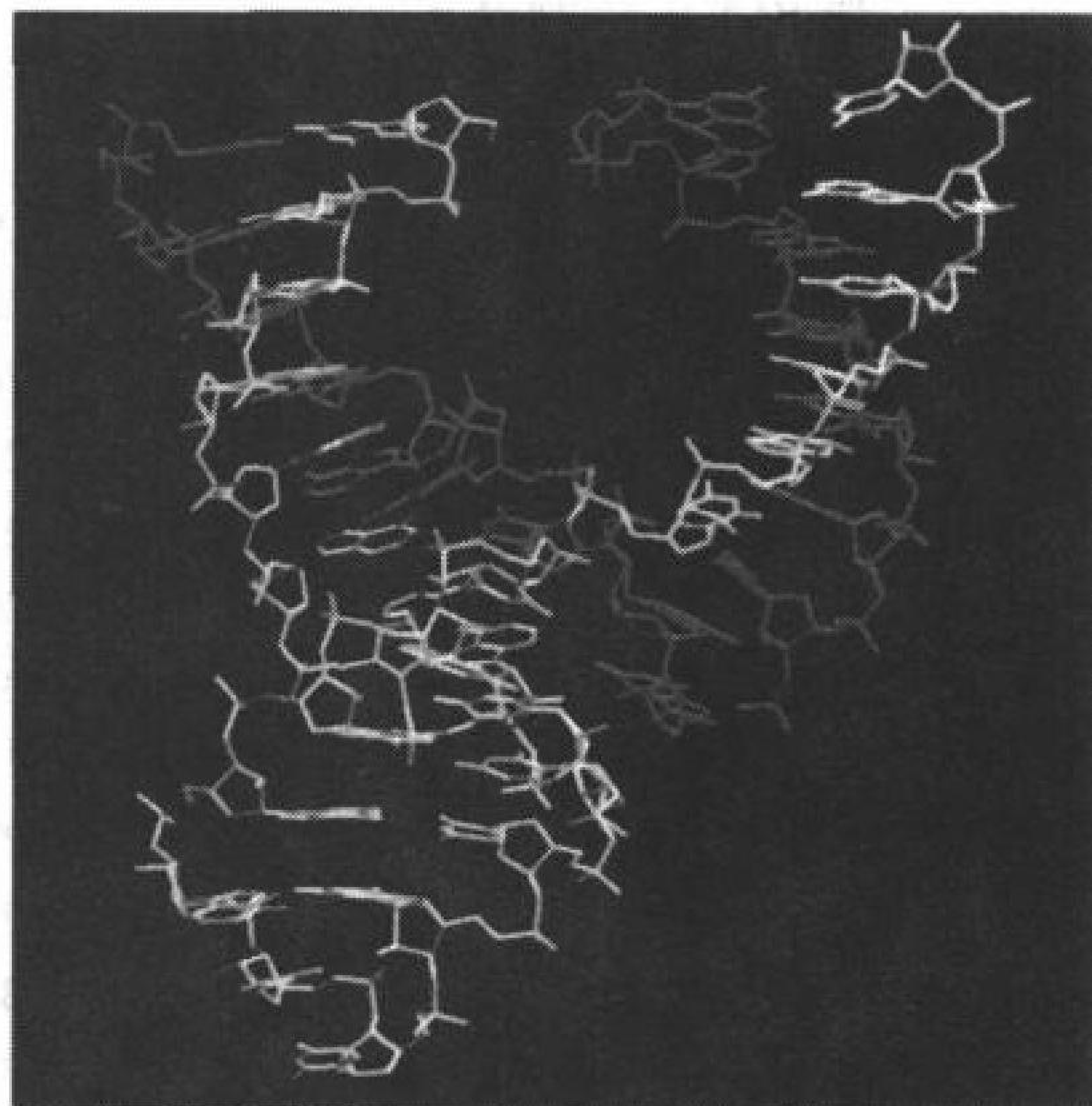
目　录







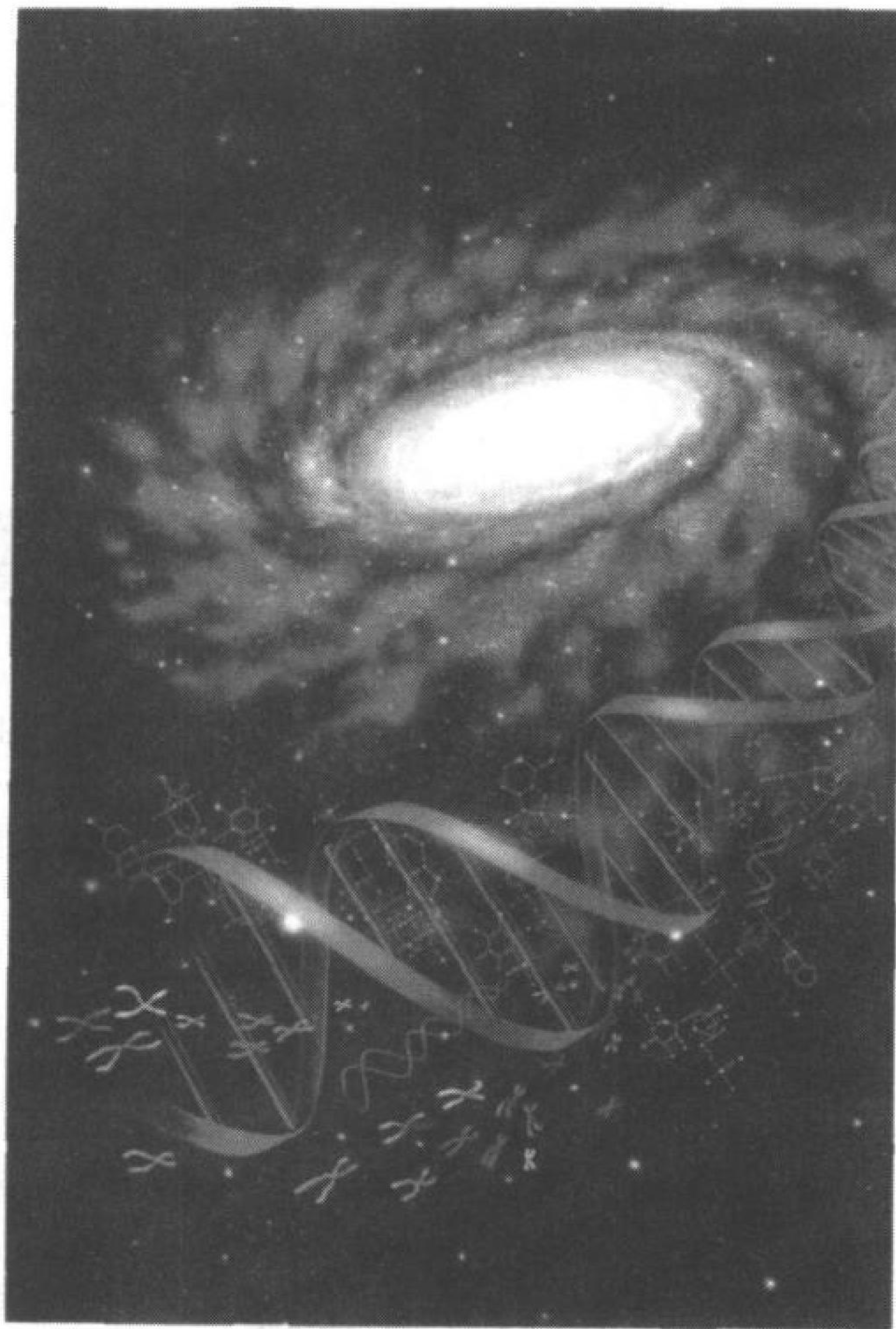

αN
βN
γN



第一篇　导　　言



第1章 生　　命



早期的地球，是银河系中的一个微小斑点，含有简单的无机分子，而后出现了第一个生物大分子。接着这些大分子获得了自组装和自复制的能力，最后形成了细胞的生命形式。（引自 Lynette Cook）

4[①]

简言之，生物化学是研究生命的化学。尽管它和其他学科有重叠交叉，比如细胞生物学、遗传学、免疫学、微生物学、药物学和生理学，但生物化学涉及一些特定的问题，它们是：

1)生物分子的化学和三维结构是什么?

2)生物分子如何进行相互反应?

3)细胞怎样合成和降解生物分子?

4)能量如何守恒并被细胞利用?

5)组装生物分子并协调它们的活性的机制是什么?

6)遗传信息是如何存储、传递和表达的?

生物化学，同其他现代科学一样，依靠尖端精密的仪器设备去仔细分析人们的感官不能察觉的系统的结构和作用。除了化学家用的分离和定量分析的工具，以及其他分析用的生物材料以外，生物化学家利用他们独特的生物学科方面的优势去探索生物体、代谢系统和个体分子的进化历史。除了它与人类健康明显的联系外，生物化学还揭示了自然世界的活动，使我们去理解和鉴赏这个独特、神秘、被人类称之为生命的东西。

1. 生命的起源

对于所有的生物体来说，某些生物化学特征是一样的。例如，遗传信息编码和表达的途径以及生物分子为了能量而被构建和分解的途径。现代生物体内潜在的遗传和生物化学的一致性揭示了它们是由单一的祖先传下来。所有已知的社会，无论过去和现在，都有一些造物主的神话来解释生命怎样首次出现。然而，只有在现代，才有可能用科学的方法去探索生命的起源。

A. 前生物世界

具有生命的物质是由相对少量的一些元素构成的(表 1-1)。C、N、O、H、Ca、P、K 和 S 占生物体干重的 98%(大部分的生物体含有约 70%的水)。剩余的元素仅以微量存在。除了氧和钙以外，生物体中最丰富的元素仅是地球表层很少量的组分(地球表层含有 47%的 O、28%的 Si、7.9%的 Al、4.5%的 Fe 和 3.5%的 Ca)。从列出的有限的元素并不能确切地知道生命进化的机理，但根据古生物学和实验室的证据却可得到一个似乎可信的阐述。

表 1-1 人体的基本元素组成[a]

元素	干重/%	微量元素	元素	干重/%	微量元素
C	61.7	B	S	1.0	Co
N	11.0	F	Cl	0.7	Cu
O	9.3	Si	Na	0.7	Zn
H	5.7	V	Mg	0.3	Se
Ca	5.0	Cr			Mo
P	3.3	Mn			Sn
K	1.3	Fe			I

[a] 由 Frieden, E. 计算。Sci. Am. 227(1), 54~55(1972)。

① 为了方便于读者查阅，我们在正文切口处加上了原英文版书的对应页码。

所知道的最早生命的化石大约是在 34 亿年前(图 1-1)。之前的**前生物时代**(prebiotic era),即从大约 46 亿年之前地球开始形成时期,并没有留下直接的记载,但科学家仍在实验上重复这些在亿万年期间可能产生生命有机体的化学反应。

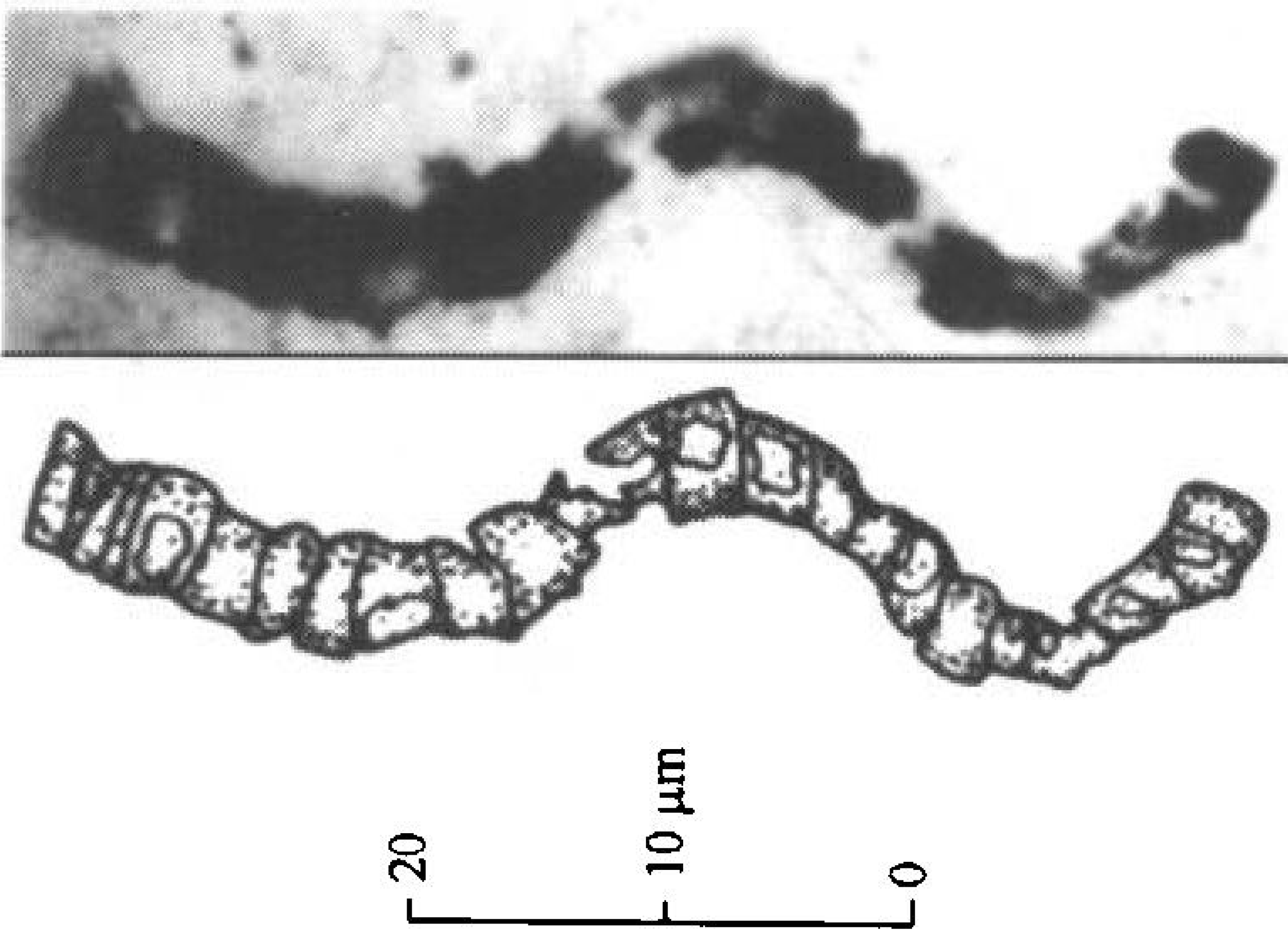


图 1-1 纤维状细菌细胞的微体化石
这个化石(用示意图解释)来自于西澳大利亚约 34 亿年前的岩石。(引自 J. William Schopf, UCLA)

早期地球的大气层可能含有 H_2O、N_2、CO_2,以及少量的 CH_4、NH_3、SO_2,并且可能含有 H_2。在 20 世纪 30 年代,Alexander Oparin 和 J.B.S. Haldane 各自独立地提出了由太阳和闪电发出的紫外辐射光引起原始大气中的分子相互反应,从而形成了简单的**有机**(含碳)化合物。这个反应过程在 1953 年被 Stanley Miller 和 Harold Urey 重复,他们使 H_2O、CH_4、NH_3 和 H_2 的混合物经过放电大约一周,结果溶液中出现了水溶性的有机化合物,其中最丰富的列在表 1-2 中。某些可溶性的化合物是蛋白质中的氨基酸组分,而其他一些,正如我们所预见的,在生物化学上也是很重要的化合物。

5

表 1-2 电花激发 CH_4、NH_3、H_2O 和 H_2 的混合物得到的产物

化合物	产率/%	化合物	产率/%
甲酸	4.0	α-羟基丁酸	0.34
甘氨酸[a]	2.1	丁二酸	0.27
乙醇酸	1.9	肌氨酸	0.25
丙氨酸[a]	1.7	亚氨基乙基丙酸	0.13
乳酸	1.6	*N*-甲基丙氨酸	0.07
β-丙氨酸	0.76	谷氨酸[a]	0.051
丙酸	0.66	*N*-甲基脲	0.051
乙酸	0.51	脲	0.034
亚氨基二乙酸	0.37	天冬氨酸[a]	0.024
α-氨基-*n*-丁酸	0.34	α-氨基异丁酸	0.007

[a] 蛋白质的氨基酸成分。

来源:Miller, S.J. and Orgel, L.E., The Origins of Life on Earth, p.85, Prentice-Hall(1974)。

其他的试验表明,氢氰酸(HCN)和甲醛(CH_2O)能生成核酸碱基和糖类。这些化合物作为生物分子的基本组成成分或许并不是偶然的。在前生物时代,它们显然是最普通的有机物质成员。在这些物质中所谓的**功能基团**(functional group)对于当今它们的生物学活性都是关键性的。生物化学中一些最普通的功能基团如图 1-2 所示。

6

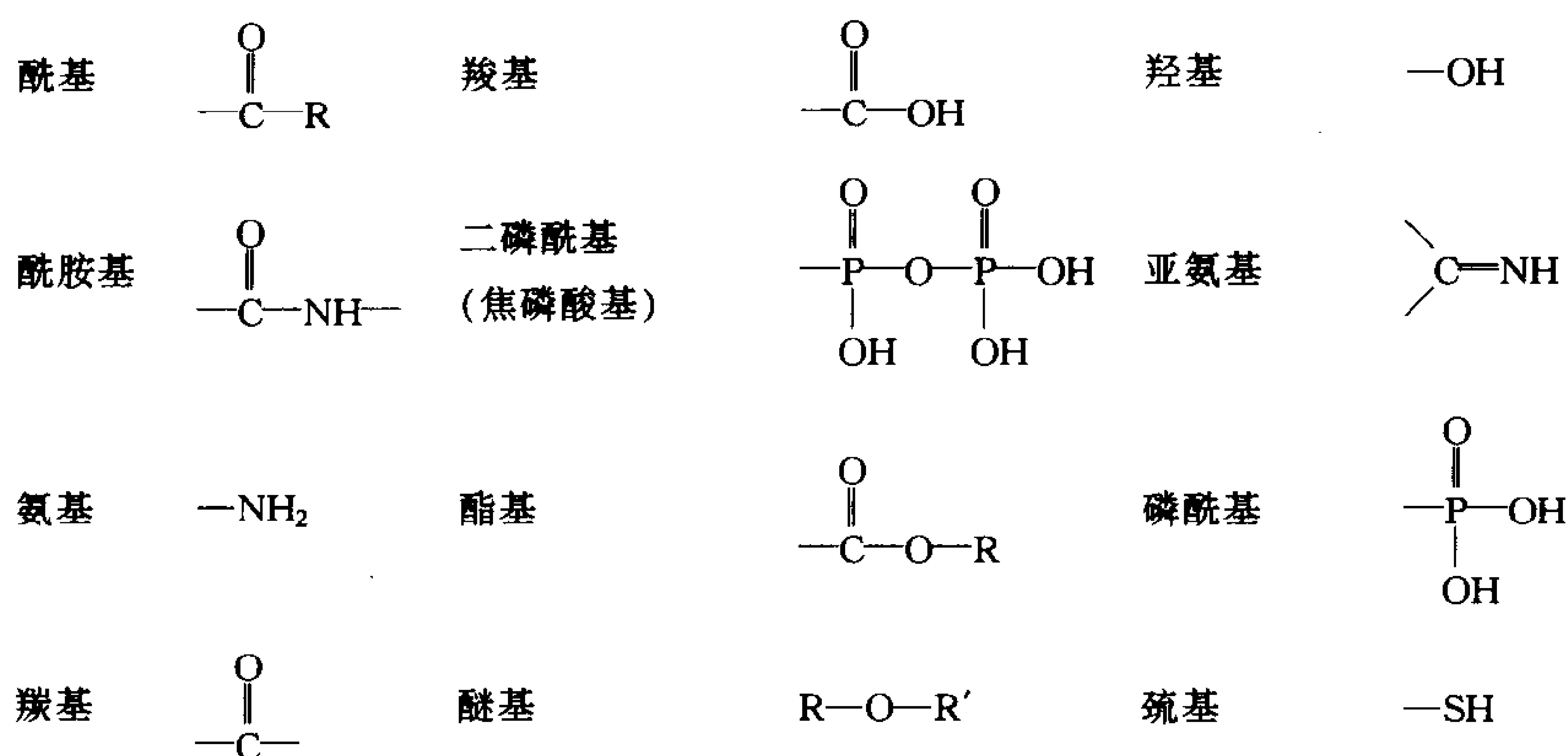


图 1-2 结构的秘诀：生物化学中常见的功能基团
氨基，羧基和磷酰基在生理条件下常被电离。

B．化学进化

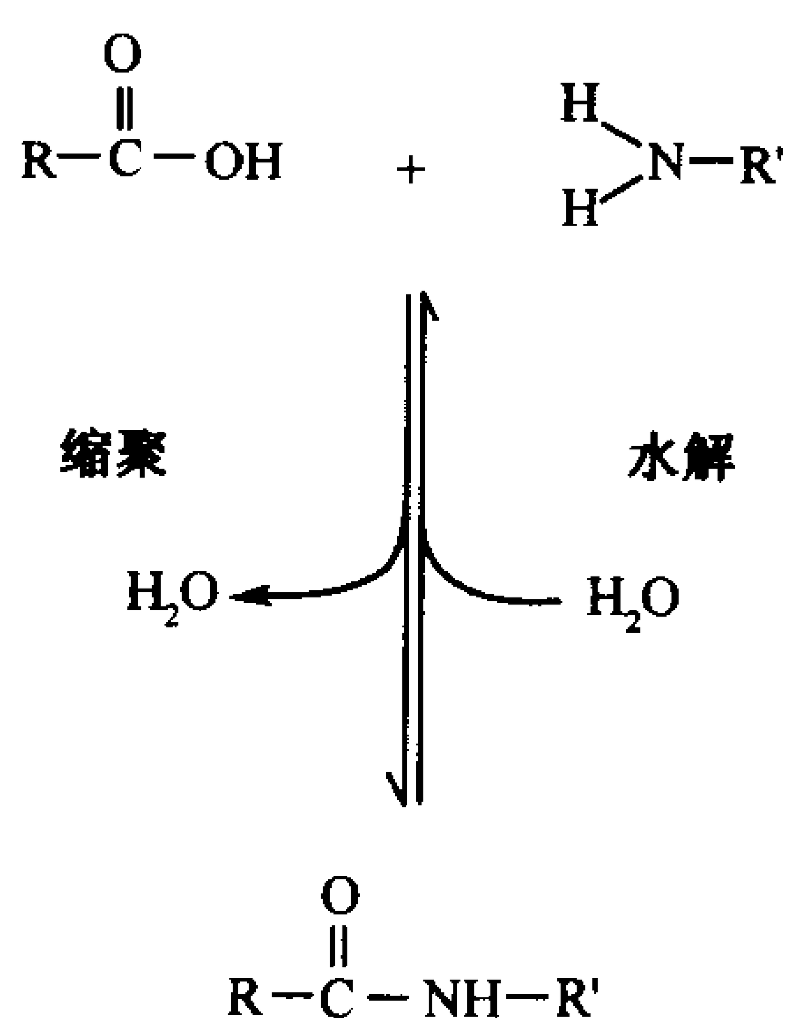


图 1-3 羧酸和胺的反应
在缩聚时，水被释放出来。在可逆的过程即水解时，水被加入并打开酰胺键。在生命系统中，缩聚反应不会自发地可逆进行。

即使将目前天然的，并尽可能丰富的生命物质堆积在深的水池中或浅的湖泊里，生命也不会立即出现。在**化学进化**(chemical evolution)期间，简单的分子缩聚形成比较复杂的分子或头尾结合形成重复单元的**聚合物**(polymer)。在一个**缩聚反应**(condensation reaction)中，水失去。所以简单化合物缩聚形成稳定的聚合物的速率一定比**水解**(hydrolysis)(通过加上水而分解，图 1-3)的速率大。在前生物时代的环境条件下，像黏土这类矿物质可能会催化聚合反应的发生，并且将这些反应产物和水分离。前生物时代大分子的大小和组成将受起始小分子材料的可获得性、结合效率以及它们对降解的抗性所限制。

很显然，结合不同功能基团而成为一个单一的大分子，增加了该分子的化学功能，使它具有超出简单分子所有的化学特征。(这个自然特性原理可以被表达为“整体比各部分加和更好”。)具有互补排列功能基团的不同大分子能相互结合(图 1-4)，形成更高功能特性的复合分子。

在互补功能基团之间，特定的配对意味着这一对中的一个能决定另一个的特性和取向。这样的**互补性**(complementarity)，通过比较小的互补单元直接组合成一个新的分子，它使得一个大分子**复制**(replication)或自身拷贝成为可能。一个具有分子内互补性的简单聚合物的复制如图 1-5 所示。一个类似的现象是 DNA 功能的核心：DNA 一条链上碱基的序列(例如 ACGT)完全确定了与之配对的另一条链的碱基的序列(TGCA)，

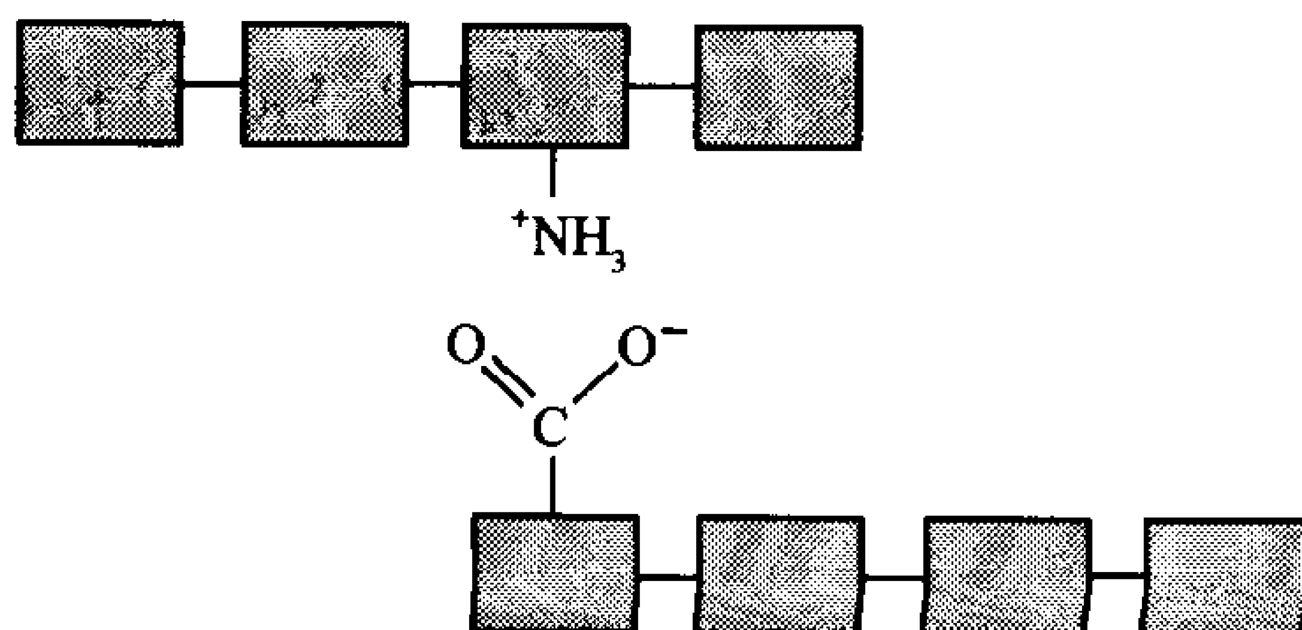


图 1-4 互补分子的结合

7

当DNA复制的时候，两条链分开并各自合成互补的子链。互补性也是DNA转录成RNA以及RNA翻译成蛋白质的一个基础。

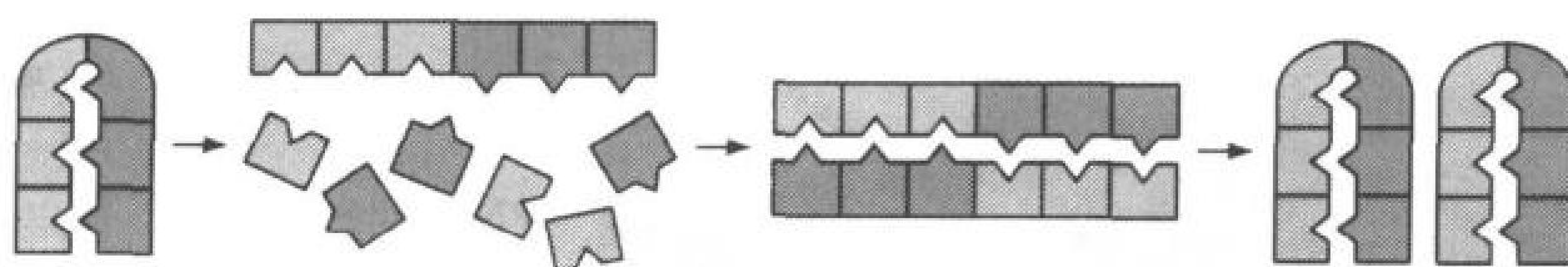


图1-5 通过互补特性进行复制
在这个简单的例子里，为了一个互补分子的组装，把一个聚合物作为模板。由于分子内的互补性，互补分子便是一个精确的原型拷贝。

在化学进化中，一个决定性的发展阶段是从随机地产生分子的系统到分子有规则的构建和特定复制的系统。一旦大分子获得了自我延续的能力，这个基本的环境将使分子富集并使它能更好地生存与繁殖。第一个复制系统无疑有点粗糙，子代分子不能完全与亲代互补。随着时间的流逝，**自然选择**(natural selection)就偏好于那些能精确复制自身的分子。

2. 细胞的结构

迄今为止，所描述的系统将必须和原始"池"中的其他组分去竞争可利用的资源。改变周围的环境条件也可以影响自我复制系统的生存。选择有利条件将会增强一个系统，并使该系统通过一些界面被隔离和保护起来。这些界面最初是如何出现的以及它们是由什么组成的，还是模糊不清的。一种理论认为，膜质**小泡**(vesicle，充满流体的囊)首先黏附然后再包裹自我复制系统。这些小泡将会成为初始的细胞。

A. 细胞的进化

细胞的区室化(compartmentation)有许多益处。一个封闭的系统除了保护细胞不受外界不利环境的影响外，还可以保持高浓度的内部组分，否则，组分就会扩散。物质的高度浓缩，使得发生的聚合反应和其他化学反应更为有效，反应的发生也更加容易。

膜包被的小室逐渐使其内容物与外界环境的组分变得不同。进化到今天的细胞包含有高浓度的离子、小分子以及一些大分子复合物，这些大分子即使在胞外存在的话，也是微量的。比如，大肠杆菌(*Escherichia Coli*)中有上百万个分子，组成大约3000～6000种不同的复合物(图1-6)。而一个典型的动物细胞则容纳有十万种不同的分子。

早期细胞依靠环境提供有机原料进行生物构建。当前生物"汤"中生命必需的有机成分在环境中越来越少时，自然选择利于那些能从一些简单却又丰富的有机**前体**(precursor)中合成所需化合物的生物体。最初的代谢反应利用从无机环境中吸收的金属或黏土作为催化剂(一种参与促进化学反应但自身不发生改变的物质)。事实上，现在细胞中的许多化学反应的核心仍然是金属离子，并且一些聚合大分子的功能基团已发展为具有催化功能的基团。

总的来说，生物合成反应需要能量。因此，最初的细胞中的反应也需要能量供给。在前生物(prebiotic)环境中，原始的高能物质的缺乏可以促进产能代谢途径的发生。例如，较早以前，就进化出光合作用来利用太阳能。然而，光合作用从水中分解出的氧气(现在大气中氧含量为

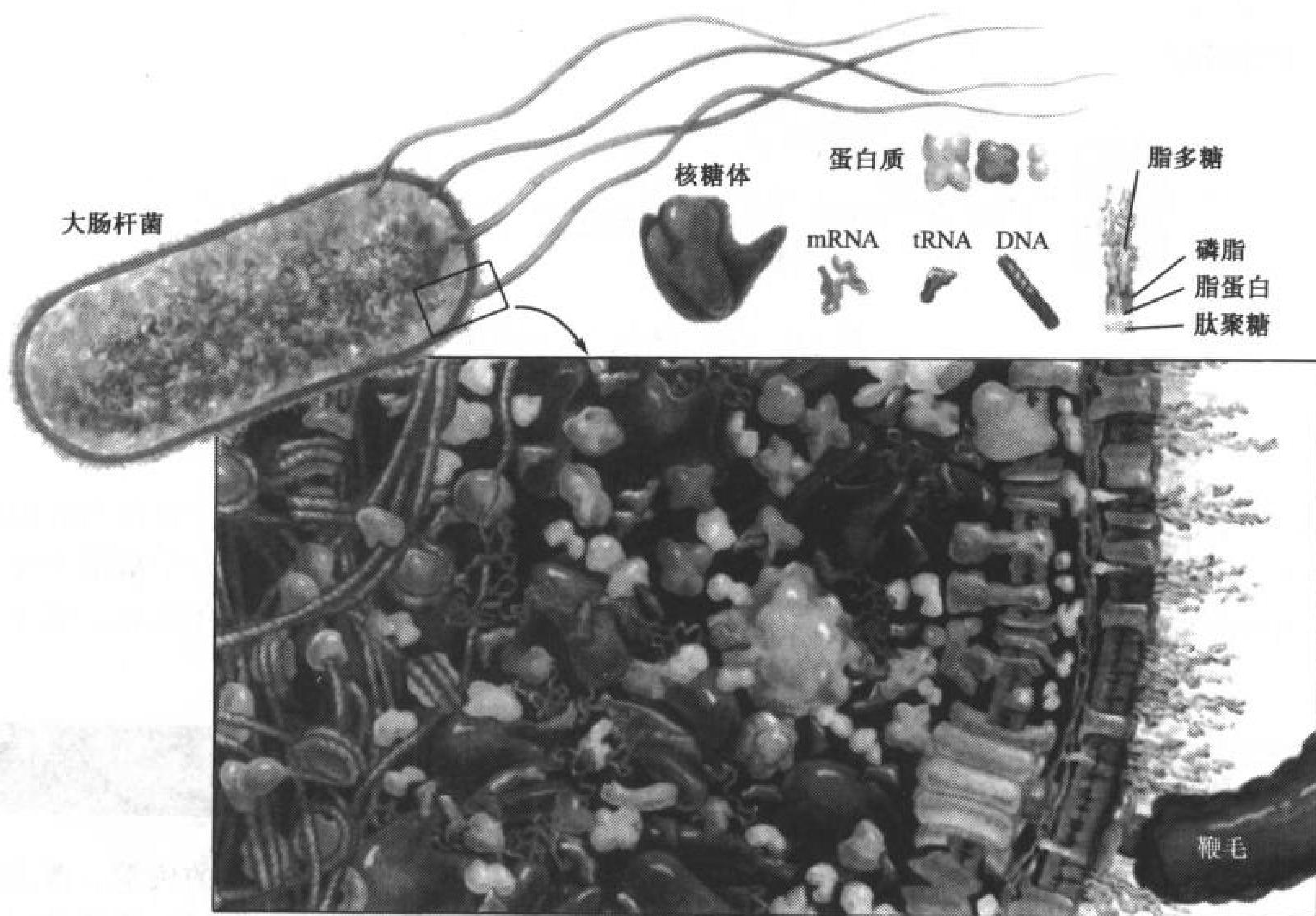


图 1-6　大肠杆菌细胞的横切面

图右边显示了多层结构的细胞壁。图中部的细胞质充满了用于蛋白合成的核糖体。图左边是紧密结合缠绕的 DNA。这幅图片是放大了一百万倍后的结果，只显示出大分子及一些分子集合体。在一个活细胞中，细胞质的剩余空间充满了小分子及水分子。(引自 David Goodsell, UCLA)

21%)，对早期生活在贫氧大气层中的生物提出了挑战。代谢机制最终不仅使生命体避免了氧化伤害，还利用氧气进行了有氧代谢。有氧代谢可以比无氧代谢获得更多的能量。从现在相当一部分生命体中的无氧代谢过程中，都可以看到远古生命的遗迹残痕。

*早期生物体进化产生的代谢策略，包括合成生物大分子，可控制性地保存和利用能量并在外膜保护的小室内复制自身，使其能在范围更广的生活环境中延续和发展。*细胞对不同外界环境的适应性最终带来了今天的生物多样性。不同细胞的特性使得多细胞生物中各类细胞共同工作变成可能。

B. 原核生物和真核生物

现代生物体都以同一形态单位(细胞)构成。它们可以分成两大类：**真核生物**(eukaryote)，具有明显被膜包围的核，DNA 集中在核内；**原核生物**(prokaryote)，无典型的核。*原核生物，包括各种各样的细菌，它们的结构相对简单，并且以单细胞形式存在*(尽管它们中也有以丝状体或菌群的形式存在)。*真核生物，既有多细胞生物也有单细胞生物，比原核生物复杂得多。*[**病毒**(virus)比细胞更为简单，而且它们在宿主之外没有进行代谢的器官。]

原核生物是地球上数量最大、分布最广的生物体。正是由于它们品种多样且高度适应的代谢机制使得它们广泛分布。原核细胞的大小为 1～10μm，分为 3 种基本形态(图 1-7)：球状(球

菌)、杆状(杆菌)、螺旋状(螺旋状菌)。除了外层细胞膜外,在大多数情况下,细胞膜常常被保护性的细胞壁包裹,原核生物没有细胞膜。原核细胞的**细胞质**(cytoplasm)也不均匀,细胞质的不同区域执行不同的代谢功能(图1-6)。最典型的原核生物是大肠杆菌(*E. coli*),一种2μm长、1μm宽、生活在哺乳动物结肠内的杆状细菌。

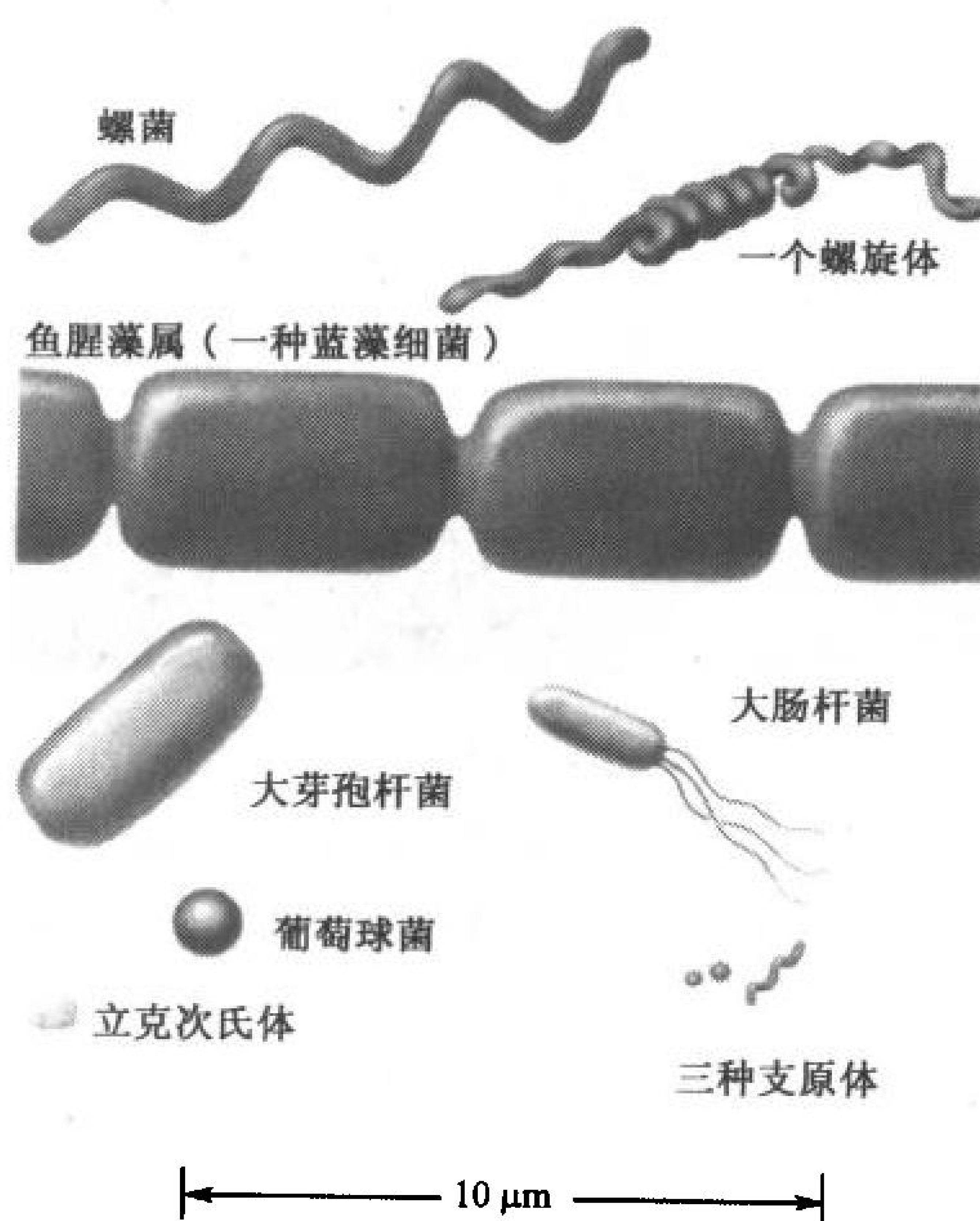


图1-7 一些原核细胞的形态

真核细胞直径通常为10~100μm,体积比典型的原核生物大上千倍到百万倍。然而,并不是体积大小,而是丰富的膜包裹的**细胞器**(organelle)显示出真核生物的特征(图1-8)。除细胞核外,真核细胞内还有**内质网**(endoplasmic reticulum),它是合成许多细胞组分的地方,其中的一些组分最终在**高尔基体**(Golgi apparatus)内被修饰。几乎所有真核生物都具有发生氧化作用的**线粒体**(mitochondria),光合作用的细胞含有**叶绿体**(chloroplast)。其他的细胞器,如**过氧化物酶体**(peroxisome)和**溶酶体**(lysosome),执行特定的功能。**液泡**(vacuole),主要存在于植物细胞中,具有存储的功能。**胞液**(cytosol,细胞质中除去细胞器的成分)被**细胞骨架**(cytoskeleton)分为许多小室,细胞骨架维持细

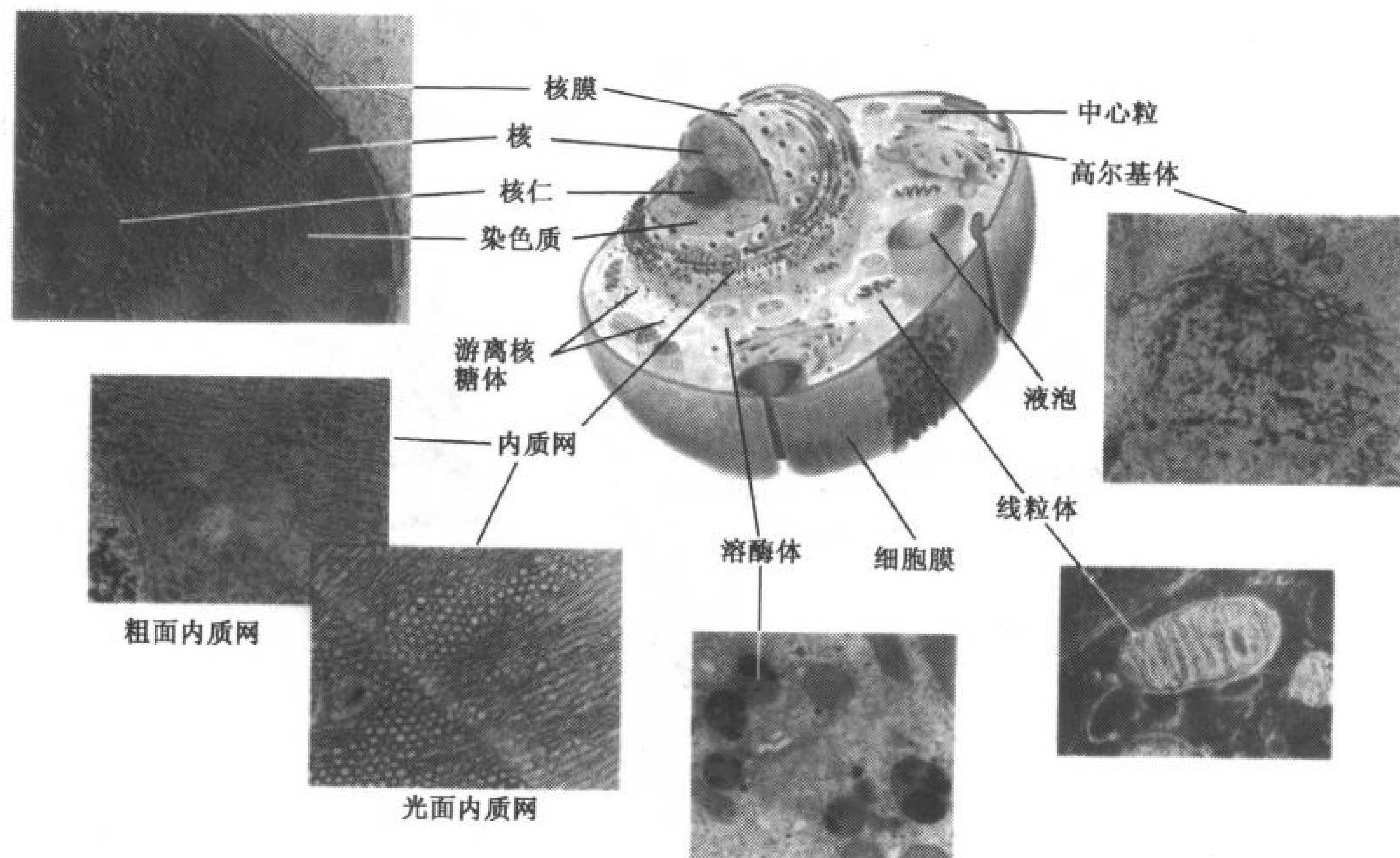


图1-8 典型动物细胞图示及细胞器的电子显微图像

膜包裹的细胞器包括细胞核、内质网、溶酶体、过氧化物酶体(未示)、线粒体、液泡和高尔基体。细胞核包含染色体(DNA与蛋白质的复合物)和核仁(核糖体合成位点)。粗面内质网表面附着核糖体,光面内质网表面没有。一对中心粒辅助构成细胞骨架组分。典型植物细胞的主要特征是具有外部细胞壁和细胞质中有叶绿体。

胞的形状及运动。

上述各种各样的细胞器，大部分在原核细胞中不存在，显示了真核细胞的复杂水平。然而，原核细胞利用它简单、微小的特点，在许多方面比真核细胞的行为更为高效。原核细胞生长的高速率使它们可以在营养变动激烈的生态环境下生存。相对来说，真核生物的复杂性，使得它们的生长比原核生物缓慢得多，使它们在稳定但资源有限的环境中具有竞争力。因此认为原核生物在进化上比真核生物原始的观点是错误的，两种生物体都相应地适应它们自己的生存环境。

3. 生物进化

追寻不同物种的起源，确定它们可能的进化历史，是十分有价值的。因为特定的生物化学适应性的生物学意义，常常从研究它如何进化来正确评价。相关进化上的信息，如同结构和化学方面的信息一样，对于了解生命在分子水平上的活动是很有用的。

A. 形态分类学和系统发育学

因为没有核结构而将所有的原核生物归于一类，这样的做法忽略了它们的代谢多样性和进化史。相反地，真核生物形态上明显的多样性(比如阿米巴虫、栎树及人在解剖学上的不同)掩饰了它们在细胞水平上的相似性。传统的**分类学**(taxonomy，对生物分类的科学，建立在形态的差异上)已被证实不足以描述出生物体在进化史[**系统发育**(phylogeny)]上真实的关系。事实上，林奈(Carolus Linnaeus)在17世纪中叶建立的分类命名法则，界、门、纲、目、科、属、种，在相当部分的生物中强加了人为的区分，并且根本不适用于原核生物。(然而，林奈系统中通过种和属来鉴别独特生物的便利性使它不会在短时间内被人们所丢弃。)

建立在生殖或发育机制上的生物学分类方法比完全依赖成体形态学分类更能准确地反映生



图1-9 系统发育树显示生物体的三个类群

图中分支表明起源于同一祖先但进化的方向不同。与细菌一样，古细菌也是原核生物，但与真核生物有更多的相似性。[引自 Wheelis, M.L., Kandler, O. and Woese, C.R., Proc. Natl. Acad. Sci. USA89, 2931(1992)]

物进化史。但是生物在系统发育上的关系通过比较聚合大分子(DNA、RNA或者蛋白质——来自不同的生物体)能更好地得出。例如,Carl Woese通过RNA分析将所有生物体分为3类(图1-9)。**古细菌**(archaea也叫archaebacteria)是与**细菌**[又称**真细菌**(eubacteria)]相区别的另一类原核生物,它们共同构成原核生物。古细菌包括一些罕见的生物:**产甲烷菌**(methanogen,可以释放CH_4)、**嗜盐细菌**(halobacteria,生活在高盐浓度下)和一些**嗜热菌**(thermophile,生活在温泉中)。古细菌不仅仅是罕见的细菌,它们的遗传物质在某些地方与真核生物更为近似。

Woese提出的进化树模型反映了不同物种之间的异化(每一个分支表明它们来源于同一个祖先)。三类群系统也反映出动物、植物和真菌只是生命形式中的一小部分。这样的系统发育树对化石纪录进行了补充,化石纪录只提供一些距今6亿年前的生命形式的零星记录(多细胞生物体大约出现在7～9亿年前)。

B. 复合性的起源

最终来说,细菌、古细菌、真核生物毫无疑问地共同起源于有机复合物,并由此复合物形成今天生物体的所有特征。真核生物不可能起源于高度发展的原核生物,因为细菌和真核细胞之间的差异是如此复杂。根据化石证据来推测最早的真核细胞可能起源于最原始的一种十分稀少的生命形式。只有当进化出复杂的膜包裹的细胞器后,才可能留下明显的化石遗迹。

进化发生过程中产生了今天多种多样的细菌、古细菌和真核生物,其中最引人注目的是有性生殖的出现。遗传物质的交换增大了生物体对环境变化的适应能力。另一个相关的发展是多染色体的出现(原核细胞仅有一条染色体),允许真核细胞有效地储存和复制更多的遗传信息。　12

更多关于真核细胞复合性的起源的线索可以从线粒体和叶绿体中发现。这两种细胞器与细菌的形状及大小相似,并且都有自己的遗传物质和蛋白质合成系统。根据这些事实,Lynn Margulis提出线粒体和叶绿体是由与最初的真核生物存在**共生**(symbiotic)关系的好氧菌进化而来的假设。据假设,真核生物宿主为共生的原核生物提供营养和保护性的环境;相反地,真核生物也利用了原核生物高效的需氧代谢。通过对缺乏叶绿体或线粒体的真核生物的观察,发现它们长期与共生性细菌共生,证实了上述假设。

进化史上有些观点认为,个体真核细胞间互相有益的作用推动了多细胞生物体的产生,经过功能分工后的多细胞生物体更有竞争力。相似的法则毫无疑问也反映了在更高一级系统的形成中,例如在一个生态体系中,个体及种间的相互作用形成社会。

C. 生物体如何演化

如同引导生命前物质演化一样,自然选择指导生物体的进化过程。Richard Dawkins把进化看作与盲人会遇到各种复杂突发事件一样,尽管这并不能解释在漫长的岁月里如此复杂生物体的出现。由于物理伤害或复制过程中的遗传错误,会造成一些小的**突变**(mutation)。因为变异会给生物体带来更多的生存机会,所以变异又可能会被传递到下一代中。有益的变异会很快地波及到整个种群,而有害的变异会造成存有这种变异个体的死亡。

尽管早在19世纪60年代达尔文(Charles Darwin)就最先提出用自然选择解释进化学说,但直到最近这个学说才被实验证明。在研究进化中,细菌十分有用,因为它们繁殖迅速并且对实验条件要求低,大约只需20min就可以繁殖一代。Richard Lenski对上千代细菌对不同环境的适应性进行了研究。实验证据、分子信息和化石纪录的相似性显示了某些重要的进化法则(但常被误

解)：

1)进化方向并不特定。在一定环境下,能够影响到生物体繁殖的随机变化引导进化。当环境改变时,很好适应原来环境的生物体也许会生存得更好或更差一些。

2)进化需要某些固有的随意性。这点能让生物体适应不可预料的改变。为什么遗传上相似的种群(例如某些谷类作物)易于被一个单一的挑战所影响(如一种昆虫),而一个不均一的生物种群对厄运有更多的方法来抵抗并且易于恢复,这是其中的一个原因。

3)进化过程有相关性。新的结构和代谢机能是从已存在的成分中起源的。举个例子,昆虫的翅膀不会自然而然地一下长出,而可能是逐渐从一个小的热交换结构中发育而来的。

13

4)进化是不断进行的。进化并不总是惟一地向着复杂化方向进行的。人类为宇宙中心的观点将人类看作进化的顶点,但是从生命多样性的角度俯瞰,简单的物种既没有消亡也没有停止进化。

由于进化理论能解释许多现象,所以已被普遍地接受。无论怎么进行持续的实验观察来证实自然选择的进化理论,进化历史的复杂性都几乎不可能准确预言何事以及它将何时发生。而就我们目前的理解水平来看,预言进化的发展方向也是不可能的。

4. 热力学

生物体的一般行为,如运动、生长、繁殖,都需要不断供给能量。即使是休息,生物体的一部分生物化学机构仍进行活动以便获取或利用能量。研究能量及其对物质的作用属于**热力学**(thermodynamics)的范畴。尽管生命系统给热力学分析提出了某些挑战,但*生命仍然遵循热力学定律*。

A. 热力学第一定律:能量守恒

热力学研究中,**体系**(system)被定义为总体中所涉及的要研究的部分,如一个反应器或一个生物体;**环境**(surrounding)又称外界,指的是反应体系之外的部分。*热力学第一定律就是能量*(U)*守恒定律*:能量既不会创生,也不会消亡。体系能量的改变就是体系从外界中吸收的**热量**(q)与体系对外界做**功**(w)的差值:

$$\Delta U = U_{末} - U_{始} = q - w \qquad [1\text{-}1]$$

热反映了分子的无规则运动,而功被定义为力乘以在它作用下移动的距离。力可以有各种形式,如物体间的万有引力、气体扩张时的压力、弹簧或肌肉纤维产生的张力、电荷之间的电作用力,以及由于摩擦及黏滞而产生的耗能力。

多数的生物化学过程都是在恒压下发生的。在这种情况下,气体扩张做功(压力 - 体积功)记作 $P\Delta V$。于是,可以很方便地定义一个新的热力学量,称为**热焓**(enthalpy),用符号 H 表示:

$$H = U + PV \qquad [1\text{-}2]$$

在恒压条件下:

$$\Delta H = \Delta U + P\Delta V = q_p - w + P\Delta V \qquad [1\text{-}3]$$

q_p 表示恒压下吸收的热。现在,认为仅是压力 - 体积功(在化学反应中,其他形式的功通常都被忽略),则

$$\Delta H = q_p - P\Delta V + P\Delta V = q_p \qquad [1\text{-}4]$$

此外，在大多数生化反应中，体积的变化是微乎其微的，因此 ΔU 与 ΔH 之间的差可以忽略。热焓，像能量、热和功一样，都用同一个单位，即焦耳(一些常用的单位和一些生化常数及换算见框1-1)。 14

框1-1　生物化学焦点

生化常数

现代生物化学通常采用国际单位系统(SI)，包括米(m)、千克(kg)、秒(s)，以及它们衍生出的热力学和其他测量单位。下表列出常用的生化单位、某些有用的生化常数和一些换算因子。

单位

能量，热量	焦耳(J)	$kg \cdot m^2 \cdot s^{-2}$ 或 $C \cdot V$	电压	伏特(V)	$J \cdot C^{-1}$

单位的词头

兆(M)	10^6	纳(n)	10^{-9}	千(k)	10^3	皮(p)	10^{-12}
毫(m)	10^{-3}	尘(f)	10^{-15}	微(μ)	10^{-6}	渺(a)	10^{-18}

常数

常数	数值
阿伏加德罗常数(N)	6.0221×10^{23} 分子$\cdot mol^{-1}$
库仑常数(C)	6.241×10^{18} 电子电量
法拉第常数(F)	96 485 $C \cdot mol^{-1}$ 或 96 485 $J \cdot V^{-1} \cdot mol^{-1}$
气体常数(R)	8.3145 $J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1}$
玻尔兹曼常数(k_B)	1.3807×10^{-23} $J \cdot K^{-1}$(R/N)
普朗克常数(h)	6.6261×10^{-34} $J \cdot S$

单位换算

埃 (Å)	10^{-10} m	卡路里(cal)	4.184 J
开尔文(K)	摄氏度 (℃) + 273.15		

在这本书中，粒子的分子质量以道尔顿(Da)为单位表示。道尔顿定义为一个 ^{12}C 原子质量的1/12，并且1000Da = 1kDa。生物化学中也使用相对分子质量，相对分子质量是个无量纲的量，定义为粒子的质量与一个 ^{12}C 质量1/12的比值，用符号 M_r 表示(相对分子质量)。

热力学可以很好地指出一个过程的自发性。**自发过程**(spontaneous process)是指无需外界能量而自然发生的过程。(热力学的自发性与过程发生的快慢无关。)热力学第一定律本身并不能确定一个过程是否自发。假设将两个温度不同的物体靠在一起，热量自发地从高温物体流向低温物体，反之，则是不可能的。任何一个过程都遵守热力学第一定律，因为两个物体的总能量并没有改变。因此，需要新的衡量标准来定义自发性。

B. 热力学第二定律：熵趋向增加

*根据热力学第二定律，自发过程的共同特征是从有序到无序的转换。*在本文中，反应中的无序用体系内物质重排时的**混乱度**(W)来表示。为了使这种概念更明白，假设有一个体系，是由两个等体积的球形容器组成，其中一个充满理想气体(图1-10)。当控制阀门开启后，气体分子开始随机运动但是却平均分配进两个球体中。每个球体中存在相等的气体分子并不是什么运动定律的结果，而是因为气体分子产生其他分布的概率相当小。因此，所有气体分子自发地进入左 15

边球体的概率为零。在气体分子的重排中,能量和热焓像分子一样平均分配。

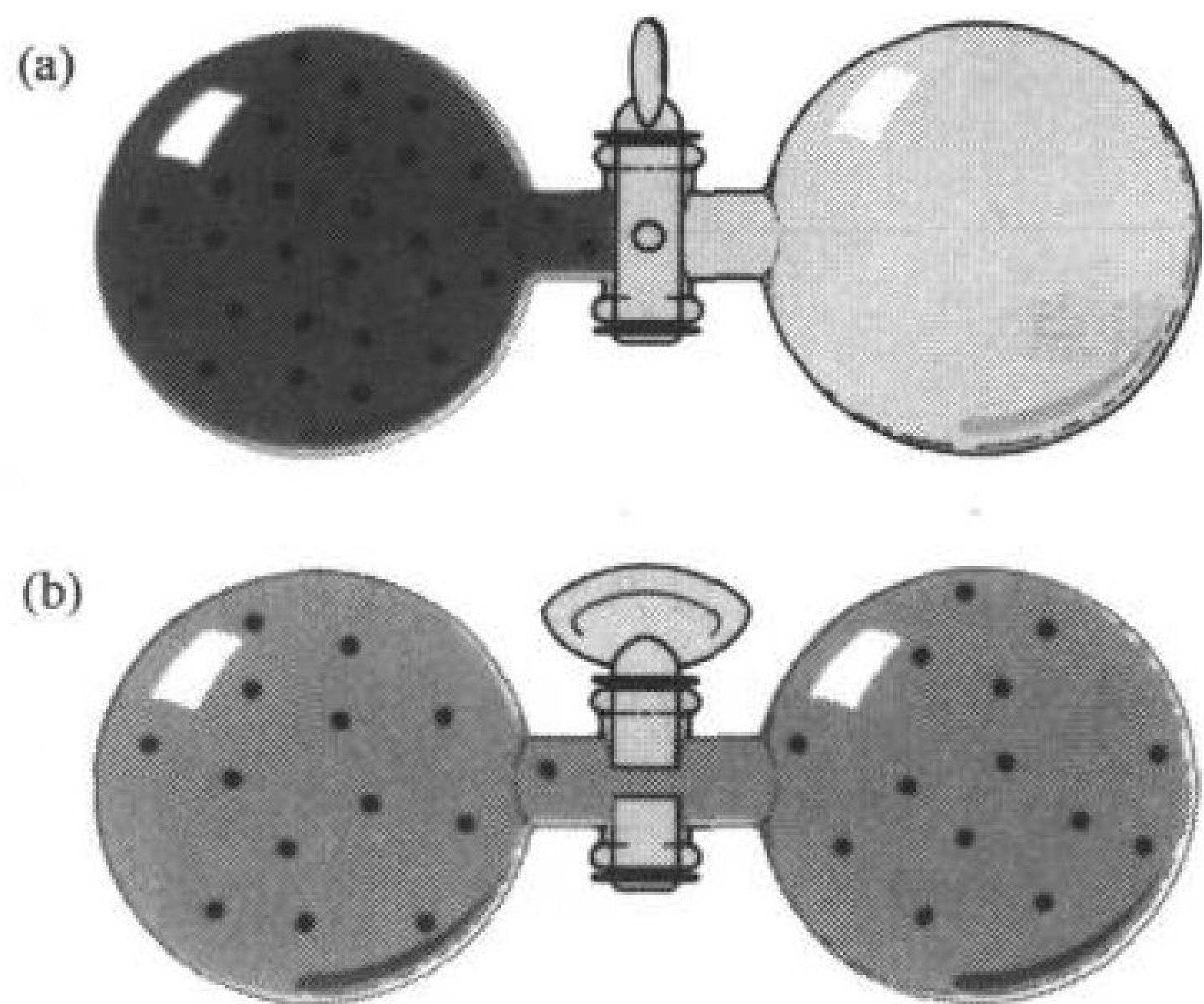


图 1-10 气体分子随机分布实验

(a)气体集中在左边球体中,且两球大小完全一样。当打开中间阀门时,则(b)气体分子在球中往返运动扩散,并且最终相等地分布在两个球体中。

一个体系的混乱程度用**熵**(entropy)来表征,并用符号 S 表示为:

$$S = k_B \ln W \qquad [1\text{-}5]$$

k_B 是**玻尔兹曼常数**,熵(S)的单位是 $J \cdot K^{-1}$(绝对温度的单位是开尔文。熵值随温度而改变,例如,当温度增加时,体系变得更加无序)。最可能发生的过程就是混乱度最大,然后熵也最大。如果像图 1-10 中的自发过程发生的话,整个能量与焓的变化是零,它的熵变一定是大于零的。也就是说,体系终态的混乱度一定要高于初始态。此外,由于

$$\Delta S_{体系} + \Delta S_{环境} = \Delta S_{总体} > 0 \qquad [1\text{-}6]$$

整个过程中熵增加,也即体系与周围环境总体的混乱度增大了。

在化学和生物体系中,通过计算混乱度来测量一个系统的熵值即使是可能的,也没有什么实际的意义。然而,有另一种等价表达熵的方法,能用到生物体系中的恒温状况:对于一个自发过程,

$$\Delta S \geqslant q/T \qquad [1\text{-}7]$$

因此,一个过程中熵值的变化能通过测量体系的热量而得到。

C. 自由能

不能仅仅依靠系统的熵变来预言一个过程的自发性。例如,2 mol 的 H_2 和 1 mol 的 O_2,有火花存在时,可以反应生成 2 mol 的 H_2O。然而两个水分子中,每个分子中三个结合在一起的原子都比原来的三个双原子分子在一起更有序。

那么,一个自发过程的热力学判据是什么呢?方程 1-4 和 1-7 表明在恒温和恒压条件下:

$$\Delta S \geqslant q_p/T = \Delta H/T \qquad [1\text{-}8]$$

于是得到,

$$\Delta H - T\Delta S \leqslant 0 \qquad [1\text{-}9]$$

这便是 1878 年 J. Willard Gibbs 提出的*自发性的准确判据*。他把这定义为 **Gibbs 自由能**,用符号 G 表示(**简称自由能**):

$$G = H - TS \qquad [1\text{-}10]$$

在恒温恒压条件下的自发过程满足如下条件:

$$\boxed{\Delta G = \Delta H - T\Delta S < 0} \qquad [1\text{-}11]$$

16

这样的变化过程是**释放能量的**(exergonic)。当 $\Delta G > 0$ 时,变化过程不能自发进行,这样的过程**吸收能量**(endergonic);它们必须在外来能量的驱动下才能进行。如果一个变化过程放能,那么它的逆过程则吸能,反之亦然。反应**平衡**(equilibrium)时,正反应和逆反应达到平衡,$\Delta G = 0$。在大多数情况下,反应的 ΔG、ΔH 和 ΔS 都可以被测出,但不能测出 G、H、S 的绝对值。

一个反应过程,当 $\Delta H > 0$ 时,只有当 $\Delta S > 0$ 且足够大时才能自发进行(表 1-3)。相反地,当

变化过程中的 $\Delta S<0$ 时，若要保证反应进行，必须 $\Delta H<0$ 且足够小。需要强调的是，即使 $\Delta G<0$ 且绝对值很大时，也不能确定过程中化学反应的速率。反应速率决定于反应的具体机理，与 ΔG 无关。

自由能与能量、热焓、熵一样，都是**状态函数**(state function)。换句话说，它们的值决定于体系当前的状态或特性，与反应过程无关。因此，热力学的测量值可以从体系变化的始态和终态得到，而不考虑过程中每一步的熵变和焓变。例如，直接测量葡萄糖在生物体中与氧反应而产生的能量变化是不可能的，因为与此同时还发生着大量其他的化学反应。但是 ΔG 只取决于始态和终态，于是葡萄糖的氧化就能在方便的仪器中被分析出来，而采用的初始物质(葡萄糖和氧气)和最终产物(二氧化碳和水)与体内是相同的。

表 1-3　反应的自发性变化(ΔG)用 ΔH 和 ΔS 表征

ΔH	ΔS	$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$
−	+	焓变(放热)和熵变两者都有利于自发反应。在任何温度下，反应都能自发进行(放能)。
−	−	焓变有利于自发反应，但熵变相反。只有当温度低于 $T=\Delta H/\Delta S$ 时，反应是自发的。
+	+	熵变有利于自发反应，但焓变相反 。只有当温度高于 $T=\Delta H/\Delta S$ 时，反应是自发的。
+	−	焓变和熵变两者都对自发反应起相反的作用。它在任何温度下都不会发生自发反应(吸能)。

D. 化学平衡和标准状态

物质的熵(混乱度)随体积增大而增加。例如，收集的气体分子占据所有可能占据的体积，它的熵值达到最大。类似地，溶解的分子能均匀地分布在溶液中。因此，熵是浓度的函数。

熵随浓度的变化而改变，自由能也是如此。所以，化学反应中自由能的变化取决于反应物和产物的浓度。这个现象具有重要意义，因为许多生化反应的进行方向都与反应物和产物的相对浓度有关。

17

平衡常数与 ΔG 的关系

物质 A 的浓度与自由能之间的关系可近似表示为：

$$\overline{G}_A - \overline{G}_A^{\circ} = RT\ln[A] \qquad [1\text{-}12]$$

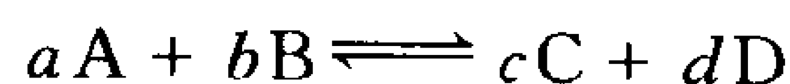
$\overline{G}_A$——**偏摩尔自由能**或 A 的**化学势**

$\overline{G}_A^{\circ}$——**标准状态下** A 的偏摩尔自由能

R——气体常数

[A]——A 的摩尔浓度

对于一般的反应：



$$aA + bB \rightleftharpoons cC + dD$$

自由能的变化是：

$$\Delta G = c\overline{G}_C + d\overline{G}_D - a\overline{G}_A - b\overline{G}_B \qquad [1\text{-}13]$$

且

$$\Delta G^{\circ} = c\overline{G}^{\circ}_{C} + d\overline{G}^{\circ}_{D} - a\overline{G}^{\circ}_{A} - b\overline{G}^{\circ}_{B} \quad [1\text{-}14]$$

由于自由能是可加的，所以，反应的自由能变化是产物自由能的总和减去反应物自由能的总和。将上述关系代入方程 1-12，可以得到：

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT\ \ln([C]^{c}[D]^{d}/([A]^{a}[B]^{b})) \quad [1\text{-}15]$$

ΔG°表示当生成物和反应物在标准状态下，反应的自由能变化。由上式可以看出，反应的自由能变化由两部分组成：①一项仅由反应确定的定值；②另一项由反应物和产物的浓度、反应的化学当量以及反应温度所决定的值。

当反应处于平衡时，正反应的自由能与逆反应的自由能达到平衡，没有自由能的变化，$\Delta G = 0$。于是方程 1-15 表示为：

$$\boxed{\Delta G^{\circ} = -RT\ln K_{eq}} \quad [1\text{-}16]$$

K_{eq}就是通常的反应的**平衡常数**(equilibrium constant)：

$$K_{eq} = [C]^{c}_{eq}[D]^{d}_{eq}/([A]^{a}_{eq}[B]^{b}_{eq}) = e^{-\Delta G^{\circ}/RT} \quad [1\text{-}17]$$

下标"eq"表示反应物和生成物的浓度是处在平衡时的浓度（由于上下文中平衡条件通常是很清楚的，因此平衡时的浓度通常省略下标 eq)。*平衡常数可以用标准自由能计算得出，相反地，标准自由能亦可由平衡常数计算出。*

K(平衡常数)与温度相关

将方程 1-11 代入方程 1-16，可以看出平衡常数随温度变化，并且得到：

$$\ln K_{eq} = (-\Delta H^{\circ}/R)(1/T) + \Delta S^{\circ}/R \quad [1\text{-}18]$$

18

H°和 S°分别表示标准状态下的焓与熵。此方程表示了线性关系 $y = mx + b$。以 $\ln K_{eq}$对 $1/T$ 作图称为 **van't Hoff 曲线**。ΔH°和 ΔS°(由此能得到 ΔG°)的值可通过两个(或更多)不同温度下测出的 K_{eq}求出。这种方法比直接用量热计测定 ΔH 和 ΔS 更有实用性。(量热计能测量一个过程的热量，q_p。)

生物化学中对标准状态的规定

为了比较不同反应中自由能的变化，必须相对于某个标准态来表示 ΔG(就如同人们将某处与海平面比较来确定高度，而海平面是人为确定的零点)。物理化学中规定，在 25℃，一个大气压条件下，溶质处于标准状态，此时，溶质的**活度**(activity)是 1(物质的活度是对非理想状态下物质浓度的一种修正。非理想状态下物质的浓度比无限稀释时的浓度要高得多)。

在大多数生化反应中，反应物和产物的浓度通常都很低(在毫摩尔或更小的数量级)，它们的活度可以由它们的摩尔浓度近似表示。然而，生化反应多发生在近中性 pH 条件下，因此，生物化学家对标准状态做了某些新的规定：

1)纯水的活度规定为 1，尽管它的浓度是 $55.5\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$。这简化了自由能的表达，在稀释溶液反应中，虽然水也是反应物，但是$[H_2O]$便可以被省略了。

2)生理条件下，pH = 7，氢离子的活度规定为 1。于是，生物化学中的标准状态是 pH = 7.0 (中性 pH，$[H^+] = 10^{-7}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)而不是 pH = 0($[H^+] = 1\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)。在物理化学中的标

准状态下，许多生物物质是不稳定的。

3)在生物化学的标准状态下，一种酸-碱反应中的物质浓度是由它在 pH=7 时所有的离子形式构成；而相对地，在物理化学中，涉及的只是在 pH=0 时存在的纯一种物质形式而不管它是否实际存在。生物化学规定的优点是，测量一个具有多种离子状态物质的总浓度要比测量某一种离子形式的浓度容易得多。由于离子的组成会随 pH 值变化而改变，所以在生化过程中规定只有在 pH=7 时，反应的自由能成为标准自由能。

经过生物化学的规定，标准自由能被简化为 $\Delta G^{\circ\prime}$，以区别于物理化学中的标准自由能 ΔG°。如果一个生化反应既没有水、H^+ 的参加，也没有一个能电离的物质，则 $\Delta G^{\circ\prime}=\Delta G^{\circ}$。

E. 生命遵循热力学定律

生物学家曾经认为生命的复杂性和有序性使它不遵循热力学定律。然而，对活体动物细致的测量实验发现，它遵循热力学第一定律预测的能量守恒。不过，要获得第二定律的实验证据是不实际的，因为这个实验需要分离生物体至分子水平，但这样会导致它的死亡。最终确定生物活体的熵比它分解后的熵值要小是可能的。*生物体一直保持不变，它可以通过很大程度上增加环境的无序性来维持自身的有序性*(方程 1-6)。生物体通过它所吸收营养物质的无序化(指物质被分解破碎)来维持自身的有序性。因此，食物的熵含量和它所含的能量是一样重要的。

19

生物体是个开放系统

经典热力学最初应用于**隔离体系**(isolated system)或**封闭体系**(closed system)中的可逆过程，特别是这个过程不能与环境发生物质和能量交换，或者仅仅有能量交换。一个隔离体系必然达到平衡。例如，当反应中反应物过量时，正向反应比逆向反应要快，直到达到平衡状态($\Delta G=0$)，正逆反应在此时平衡。和隔离体系不一样，**开放体系**(open system)与外界既有物质交换，又有能量交换，而且永远不能达到平衡。

*生命体摄入营养物质，排放废物，同时做功和放热，这是一个开放体系，并且不可能达到平衡。*它们不断地摄入高焓低熵的营养物质，最后转化为低焓高熵的废物排出体外。此过程中放出的自由能使细胞充满活性，让生命具有高度组织性。如果这个过程被破坏，体系最终趋于平衡，这对于生命体来说意味着死亡。在图 1-11 中可以看到开放体系中能量的流动。通过光合作用，植物将太阳能转化为地球上生命所需的最初能量，即碳水化合物和其他有机物质中的化学能。植物或动物摄取了这些碳水化合物或有机物质，经过代谢可以为体内的生命活动提供能量，比如说生物大分子的合成、细胞内离子浓度的维持和细胞的运动。

生物体维持一个稳定的状态

即使一个体系没有平衡，而物质和能量的流动也是按热力学定律进行。例如，物质会从高浓度区域向低浓度区域移动。这可以解释为什么血液在肺部携氧，而将 O_2 携带到氧浓度较低的组织处，因为肺部氧浓度高。

生命体系的特点是保持在**稳态**(steady state)。这就是说体系中的所有物质或能量流动是不停的，以使体系不随时间而改变。能量在生物圈的流动(图 1-11)就是一个稳定状态的例子。稳定状态的轻微改变导致能量和物质流动的改变，从而又重新使体系恢复稳定。所有的生命体系中，能量流动都向 $\Delta G<0$ 的方向进行即“向山下”(downhill)流动。此外，自然界总是在消耗能

量，所以生化过程中再生的自由能决不是自然界的全部耗能，其中总有一些能量损失在环境中。

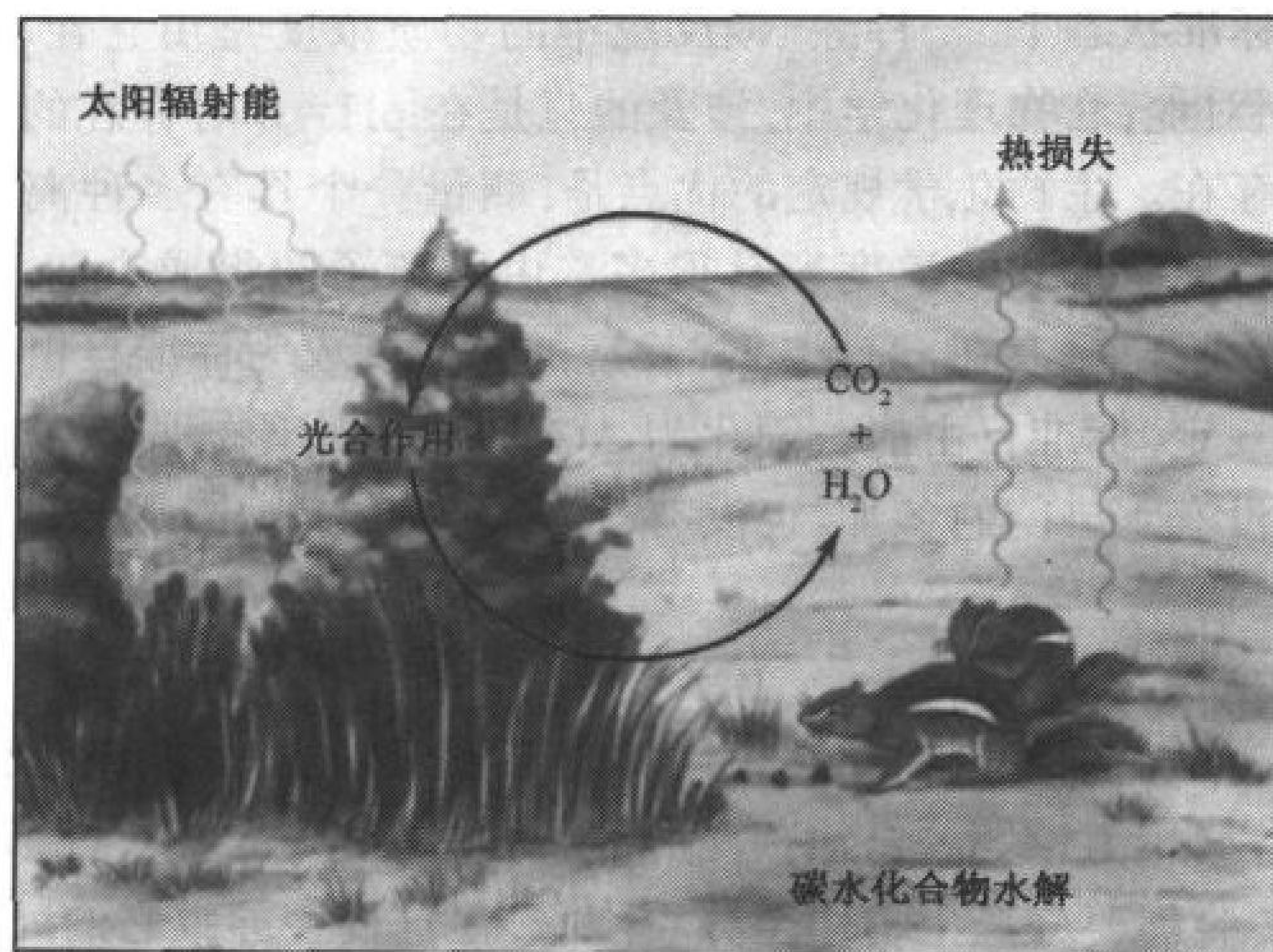


图 1-11　生物圈中的能量流动

植物利用太阳能将 CO_2 和 H_2O 合成碳水化合物，植物或动物摄取了这些化合物，并利用体内代谢将其中所含的自由能释放出来，并且将 CO_2 和 H_2O 又返还到环境中。

酶促生化反应

生物体中几乎所有的分子都可以相互反应，并且许多反应是热力学自发的，然而只有一部分反应能在生物体中发生。一个反应的速率并不取决于自由能的变化，而是由反应物转化为产物的代谢途径决定的。生物体利用**催化剂**(catalyst)，加速反应的速率使反应趋近平衡，但不影响 ΔG。生物催化剂指的是**酶**(enzyme)，通常都是蛋白质。

20

酶可以通过对反应物和产物的物理作用加速生化反应，它对于物质的转化提供了一条更有利的途径。酶通过增加反应物之间的有效相互作用来提高反应速率。然而，当反应中 $\Delta G>0$ 时，酶并不能促进反应发生。

每个细胞中都有大量的酶来调控能量的流动。当自由能被收集、储存或用来执行细胞功能时，它可以被转换到其他分子中。尽管认为自由能储存在化学键中，但是化学能可以被转化为热能、电功或者机械能，这取决于生物体的不同需要以及它在进化过程中演化出的生物化学机制。

小　　结

1. 原始生命的模型表明生物体最终起源于简单的有机分子，这些简单的有机分子可以聚合形成能自我复制的更复杂的分子。
2. 细胞小室的出现，发育出合成生物分子和释放能量的代谢反应。
3. 细胞分为原核细胞和真核细胞。真核细胞中含有各种各样膜包裹的细胞器。
4. 系统发育证明可将生物体分为三个区域：古细菌、细菌和真核生物。
5. 自然选择指导物种进化。
6. 热力学第一定律(能量守恒)和第二定律(熵增加)能应用于生化反应过程。反应能否自发进行取决于反应的自由能变化($\Delta G=\Delta H-T\Delta S$)：自发过程，$\Delta G<0$；非自发过程，$\Delta G>0$。

7. 反应中的平衡常数与反应过程中的标准自由能变化相关。
8. 生命活体是一个保持稳定状态的开放系统。

参考文献

生命的起源和进化

de Duve, C., *Blueprint for a Cell. The Nature and Origin of Life,* Carolina Biological Supply Co. (1991).
Knoll, A.H., The early evolution of eukaryotes: A geological perspective, *Science* **256,** 622–627 (1992).
Orgel, L.E., Molecular replication, *Nature* **358,** 203–209 (1992).
Schopf, J.W., Microfossils of the early Archaean Apex chert: New evidence of the antiquity of life, *Science* **260,** 640–646 (1993).
Szathmáry, E. and Smith, J.M., The major evolutionary transitions, *Nature* **374,** 227–232 (1995). [A summary of the evolution of complexity, from the origin of prebiotic systems to the emergence of language.]
Volkenstein, M.V., *Physical Approaches to Biological Evolution,* Springer-Verlag (1994).

细胞

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D., *Molecular Biology of the Cell* (3rd ed.), Chapters 1 and 2, Garland Publishing (1994). [This and other cell biology textbooks offer thorough reviews of cellular structure.]
Attenborough, D., *Life on Earth,* Little, Brown (1980). [A beautifully illustrated exposition of evolutionary development.]
Campbell, N.A., *Biology* (3rd ed.), Chapters 7 and 8, Benjamin/Cummings (1993).
Goodsell, D.S., A look inside the living cell, *Am. Scientist* **80,** 457–465 (1992); *and* Inside a living cell, *Trends Biochem. Sci.* **16,** 203–206 (1991).
Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaria, P., and Darnell, J., *Molecular Cell Biology* (3rd ed.), Chapter 5, Scientific American Books (1995).
Margulis, L. and Sagan, D., *What Is Life,* Simon & Schuster (1995). [A nontechnical review of the origin and development of life on earth.]

热力学

Tinoco, I., Jr., Sauer, K., and Wang, J.C., *Physical Chemistry. Principles and Applications in Biological Sciences* (3rd ed.), Chapters 2–5, Prentice–Hall (1996). [Most physical chemistry texts treat thermodynamics in some detail.]
van Holde, K.E., Johnson, W.C., and Hu, P.S., *Principles of Physical Biochemistry,* Chapters 2 and 3, Prentice–Hall (1998).

关 键 词

有机化合物 organic compound
聚合物 polymer
缩聚反应 condensation reaction
水解 hydrolysis
复制 replication
小泡 vesicle
区室化 compartmentation
催化剂 catalyst
真核生物 eukaryote
原核生物 prokaryote
病毒 virus
细胞核,核 nucleus
细胞器 organelle
细胞质 cytoplasm
内质网 endoplasmic reticulum
高尔基体 Golgi apparatus
线粒体 mitochondrion
叶绿体 chloroplast
溶酶体 lysosome
过氧化物酶体 peroxisome
液泡 vacuole
胞液 cytosol
细胞骨架 cytoskeleton
分类学 taxonomy
系统发育学 phylogeny
古细菌 archaea
细菌 bacteria
真核 eukarya
产甲烷菌 methanogen
嗜盐菌 halobacteria
嗜热菌 thermophile
共生 symbiosis
突变 mutation
热力学 thermodynamics
体系 system
环境 surrounding
能量 U
热量 q
恒压吸热 q_p
功 w

热焓　H

混乱度　W

熵　S

玻尔兹曼常数　k_B

自发过程　spontaneous process

自由能　G

放能的　exergonic

吸能的　endergonic

平衡　equilibrium

状态函数　state function

A 的偏摩尔自由能　$\overline{G}_A$

标准状态下 A 的偏摩尔自由能　$\overline{G}^{\circ}_A$

标准状态　standard state

平衡常数　equilibrium constant

隔离系统　isolated system

封闭系统　closed system

开放系统　open system

稳态　steady state

酶　enzyme

学习思考题

1. 概述化学进化和生物进化的主要阶段。
2. 描述自然选择进化过程。
3. 进化树的三个主要进化类群中每个类群有哪些主要生物体?
4. 解释热力学第一和第二定律。
5. 描述一个过程中自由能变化与焓变、熵变的关系。
6. 生物化学的标准状态是什么?
7. 试描述生物体是如何不顾热力学第二定律而生存的?

练　习　题

1. 确定辅酶 A(图 3-5)的功能基团。
2. 为什么细胞膜没有把细胞质和外界环境完全隔离?
3. 直径为 1μm 的球菌中,含有一个特定蛋白的两个分子。那么,这个蛋白的摩尔浓度是多少?
4. 如问题 3 中的细胞,当它的葡萄糖浓度为 $1.0 mmol \cdot L^{-1}$时,细胞中有多少个葡萄糖分子?
5. (a)0℃时,液态水和冰,哪个的熵更高?

   (b) −5℃和 −50℃之间,冰的熵值有什么不同?
6. 在下列反应中,熵是增加还是减少?

   (a) $N_2 + 3H_2 \longrightarrow 2NH_3$

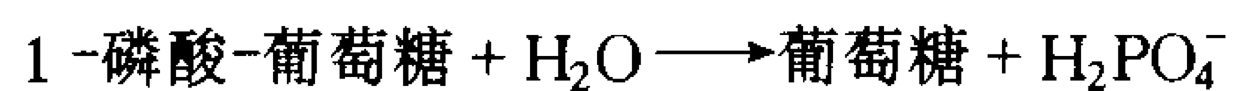
   (b) $H_2N—C(=O)—NH_2 + H_2O \longrightarrow CO_2 + 2NH_3$

   尿素

   (c) $1 mol \cdot L^{-1}$ NaCl — → — $0.5 mol \cdot L^{-1}$ NaCl

   (d) COO^-—HC—OH—$H_2C—OPO_3^{2-}$ ⟶ COO^-—HC—OPO_3^{2-}—H_2C—OH

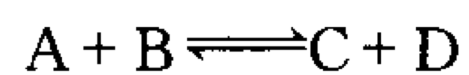
   3-磷酸甘油酸　　2-磷酸甘油酸
7. 如果一个反应,$\Delta H = 15 kJ$, $\Delta S = 50 J \cdot K^{-1}$。那么这个反应在(a)10℃,(b)80℃下,能否自发?
8. 计算下列反应的平衡常数:



$$1\text{-磷酸-葡萄糖} + H_2O \longrightarrow \text{葡萄糖} + H_2PO_4^-$$

pH = 7.0，25℃条件下($\Delta G^{\circ\prime} = -20.9\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)。

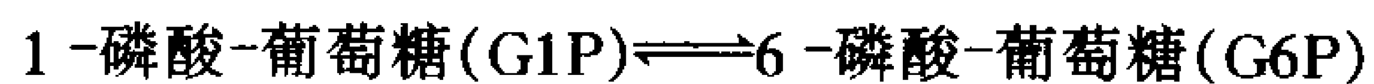
9. 计算反应



$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

在25℃下的$\Delta G^{\circ\prime}$。平衡浓度是：[A] = 10μmol·L⁻¹, [B] = 15μmol·L⁻¹, [C] = 3μmol·L⁻¹, [D] = 5μmol·L⁻¹。这个反应在标准条件下是放热还是吸热？

10. 下列异构反应

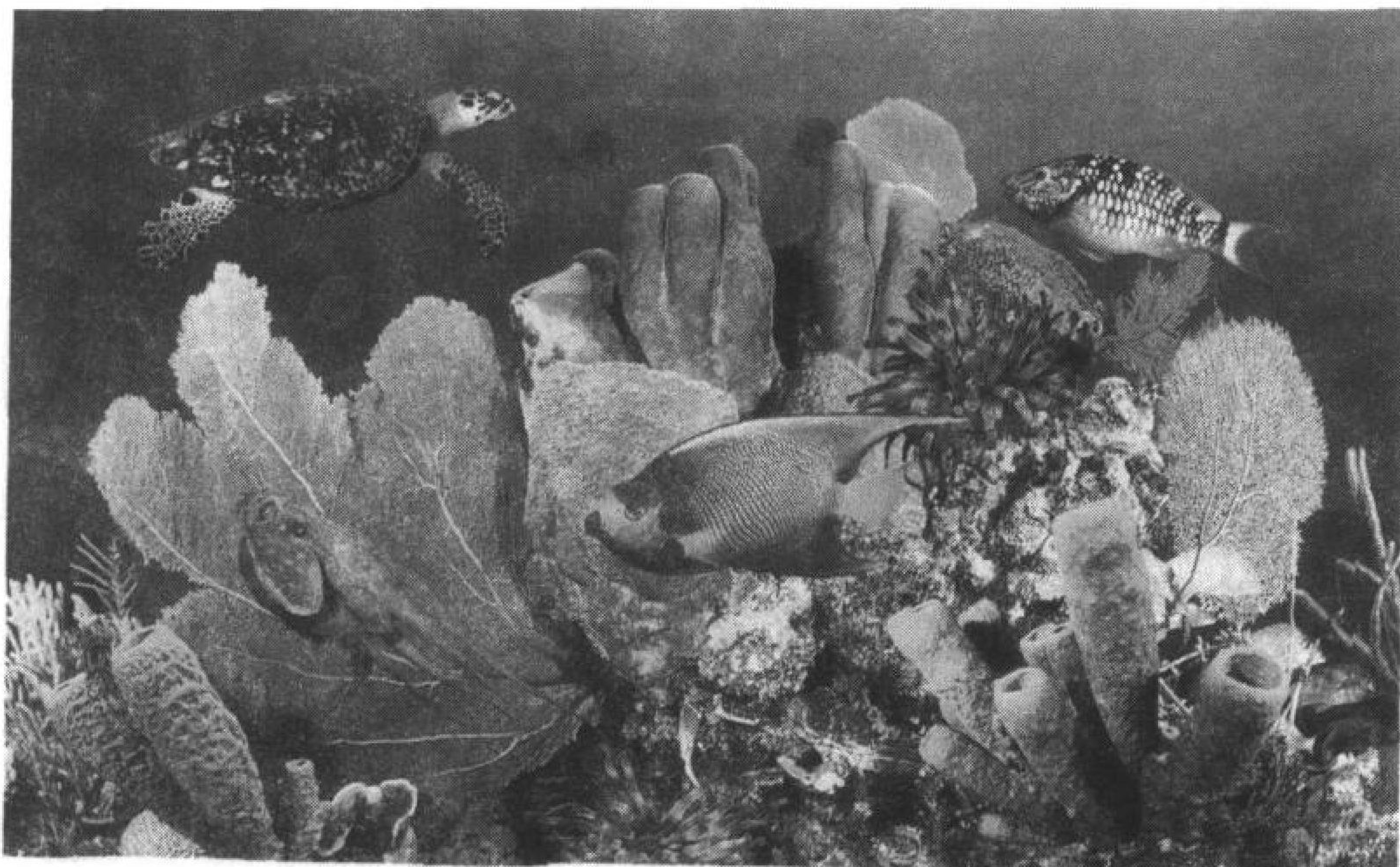


$$1\text{-磷酸-葡萄糖(G1P)} \rightleftharpoons 6\text{-磷酸-葡萄糖(G6P)}$$

的$\Delta G^{\circ\prime}$是$-7.1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$。计算在25℃平衡条件下[G1P]对[G6P]的比率。

(清华大学 段明星 译 郑昌学 校)

第2章　水



珊瑚礁支撑着各种各样的脊椎动物和无脊椎动物。围绕它们的水对于它们的生存至关重要。水是生化反应的溶剂，并且在很大程度上决定了实现这些反应的大分子的结构。(引自 Jeff Hunter)

任何生命化学的研究都必须包括对水的研究。处于水环境中，能够最好地理解生物分子及其进行的反应。生物不仅大部分由水组成(人体质量约 70% 是水)，而且这个“蓝色行星”上的生物都被水所包围。水在生物化学中的中心地位，除了因为它绝对丰富外，还有以下原因：

1）几乎所有的生物分子都根据它们对周围水的物理性质和化学性质的反应，决定它们的形状(从而也决定了它们的功能)。

2）大多数生化反应的介质是水。代谢反应的反应物和产物、营养物及废物都依靠水在细胞内及细胞间转运。

3）水本身积极参与许多维持生命的化学反应。水的离子成分 H^+ 和 OH^- 通常是真正的反

应物。事实上,生物分子的许多功能团的反应性依赖于周围介质中 H^+ 和 OH^- 的相对浓度。

4) 水的氧化产生分子氧 O_2,这是光合作用的基本反应。光合作用是一个将太阳能转变为可利用的化学能的过程。利用这种化学能最终导致 O_2 还原为 H_2O。

所有的生物都需要水,从在水环境中度过整整一生的海洋生物,到必须用保护性皮肤保护它们含水内部的陆生生物。不必惊奇,在有液态水的任何地方——温度高达 105℃ 的矿泉中,深达地表下几百米的岩石裂缝和石隙内,都能够找到生命有机体。只有当生物处于休眠时,例如种子或孢子,才能在干燥下存活。

从生物化学的角度考察,需要了解水的物理性质、水作为溶剂的性质以及水的化学性质——即水的酸碱性质。

1. 水的物理性质

无色、无臭和无味等性质掩盖水对现存生物的重要性。虽然对我们的感官来说,水的外观温和,但它决不是惰性的。水的物理性质——在类似大小的分子中很独特——使之作为溶剂具有无可比拟的长处。然而,水作为溶剂的局限性,也对生物分子的结构和功能具有重要影响。

A. 水的结构

水分子是由两个氢原子和一个氧原子组成,O—H 键距离为 0.958Å(1Å = 10^{-10}m),三个原子形成的角度为 104.5°(图 2-1)。因为氧原子的四个 SP^3 杂化轨道大致伸向四面体的几个角,所以氢原子的排列不是线性的。氢原子占据了四面体的两个角,氧原子的未成键电子对占据了另外两个角(在一个完美的四面体分子中,例如甲烷:CH_4,键角为 109.5°)。

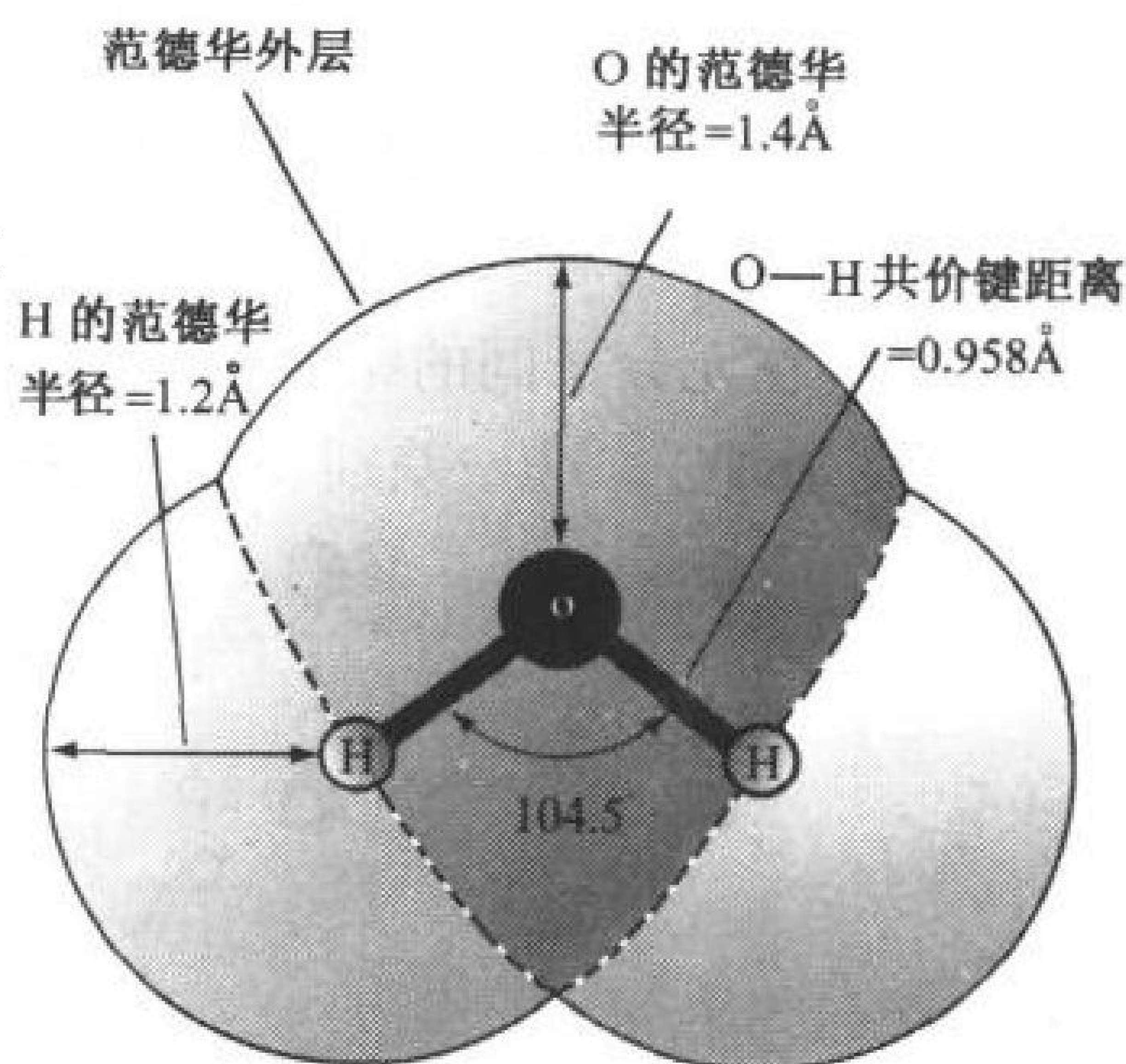


图 2-1 水分子的结构

24

水分子形成氢键

水分子的角形几何学对生命系统产生极大的影响。水是一种**极性**(polar)分子:氧原子的未共用电子带有 −0.66e的部分负电荷(δ⁻),而每个氢原子携带 +0.33e 的部分正电荷(δ⁺),这里 e 是指电子的电荷。水分子偶极间的静电吸引,对水本身的性质及其作为生化溶剂都至关重要。相邻的水分子趋向于自我定向,结果是一个水分子的 O—H 键(电正性末端)指向另外一个水分子的电子对(电负性末端),由此产生的有方向性的分子间结合称为**氢键**(hydrogen bond)(图 2-2)。

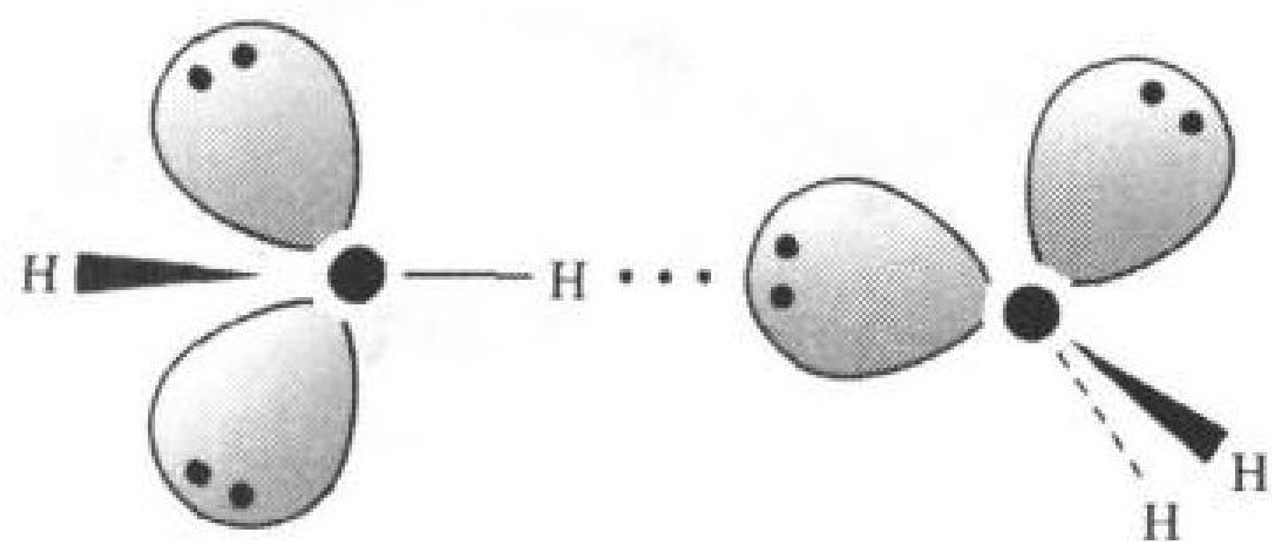


图 2-2 水分子中的氢键

一般而言,氢键可表示为 D—H···A,这里 D—H 是弱酸性"供体"基团,例如 O—H、N—H 或有时指 S—H;A 是一个弱碱性"受体"原子,例如 O、N,偶尔可为 S。

H···A 间的距离决定了氢键的结构特性，它至少比**范德华距离**(van der Waals distance)(两个非成键原子间的最近距离)短 0.5Å。例如在水中，O···H 氢键距离为约 1.8 Å，而相应的范德华距离为约2.6 Å。

单个水分子具有两个可"提供"的氢原子和两对可作为"受体"的未共用电子对，因此每个水分子能够与其他水分子最多形成四个氢键。虽然单个氢键的能量(约 20 kJ·mol^{-1})相对较小(例如一个 O—H 共价键能为 460 kJ·mol^{-1})，但是在一份水样中，氢键的绝对数量是其重要性质的关键。

冰是氢键键合水分子的晶体

冰的结构提供了一个由许多氢键形成堆积力的引人注目的例子。X 射线和中子衍射确证冰中的水分子排列成一种独特的开放结构。每个水分子被四个水分子紧邻，以氢键键合，呈四面体形包围(图 2-3)。这种开放结构的结果是：水是少数几种在冻结时膨胀的物质之一(在 0℃，液态水的密度为 1.00g·ml^{-1}；而冰的密度为 0.92g·ml^{-1})。

水在冻结时膨胀，这对地球上的生命具有无法估量的重要性。假设水在冻结时收缩，也就是说，密度变大，而不是变小，那么冰将沉到湖或海洋的底部而不是浮在上面。这种冰将与太阳隔离，因此海洋将永久性地冻结成固体(即使在热带海洋中，极深处的水接近 4℃，水在此温度密度最大)，只在温暖的天气里有一层薄薄的表面水。因此，地球将锁定于一个永久性的冰川纪，而生命也许永不会出现。

虽然液态水分子中也存在氢键，但是冰的融化表示以氢键键合的水分子精确的四面体定位的崩溃。事实上，液态水比 0℃的冰只少了约 15%的氢键。甲烷与 H_2O 的分子质量几乎相同，但不能形成氢键(在无分子间的结合时，具有相同分子质量的物质应具有相同的沸点)，实际上，水的沸点比甲烷高 264℃。这一差别反映了液态水分子由于分子间的氢键形成了超常的内部凝聚性。

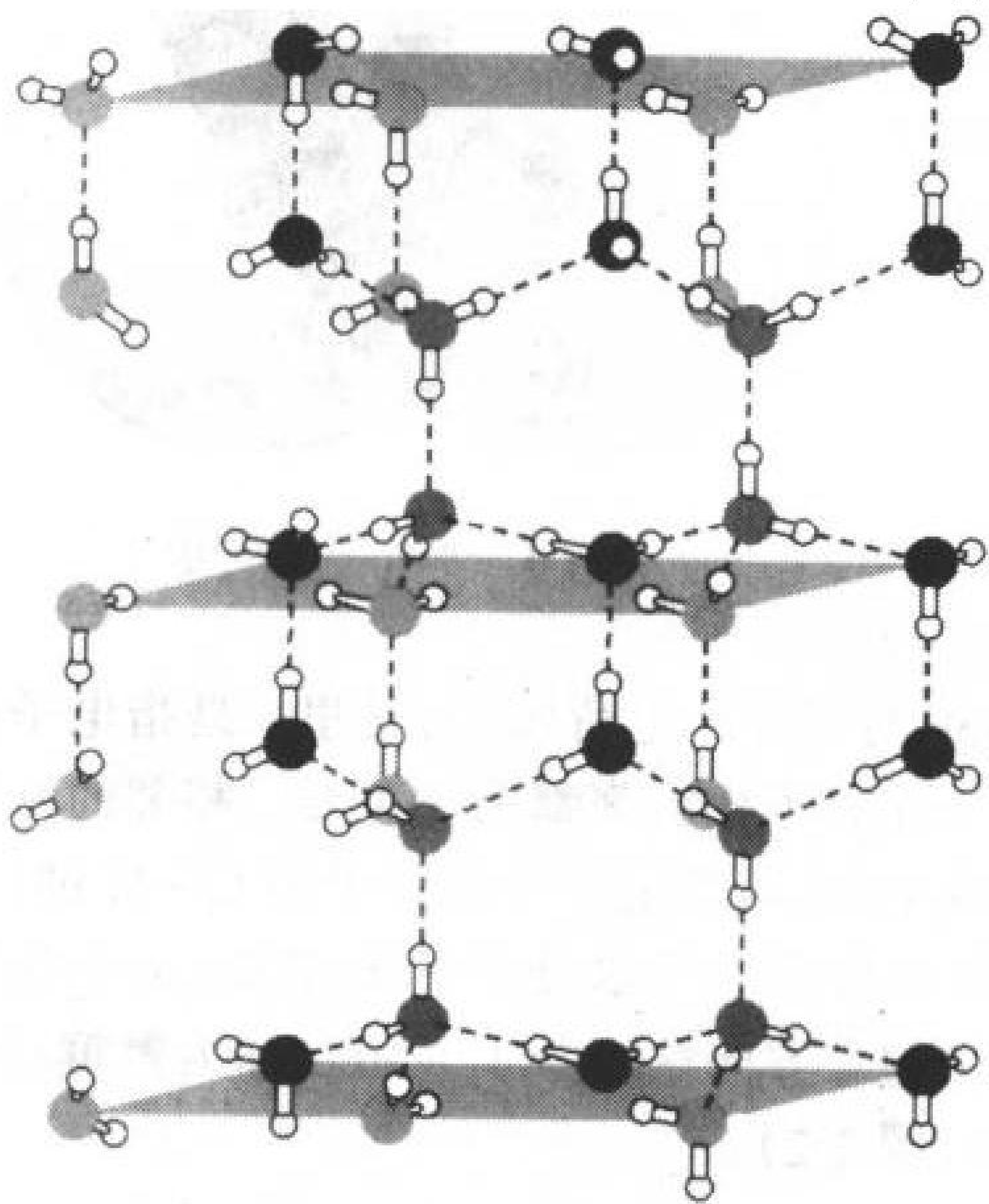


图 2-3 水的结构

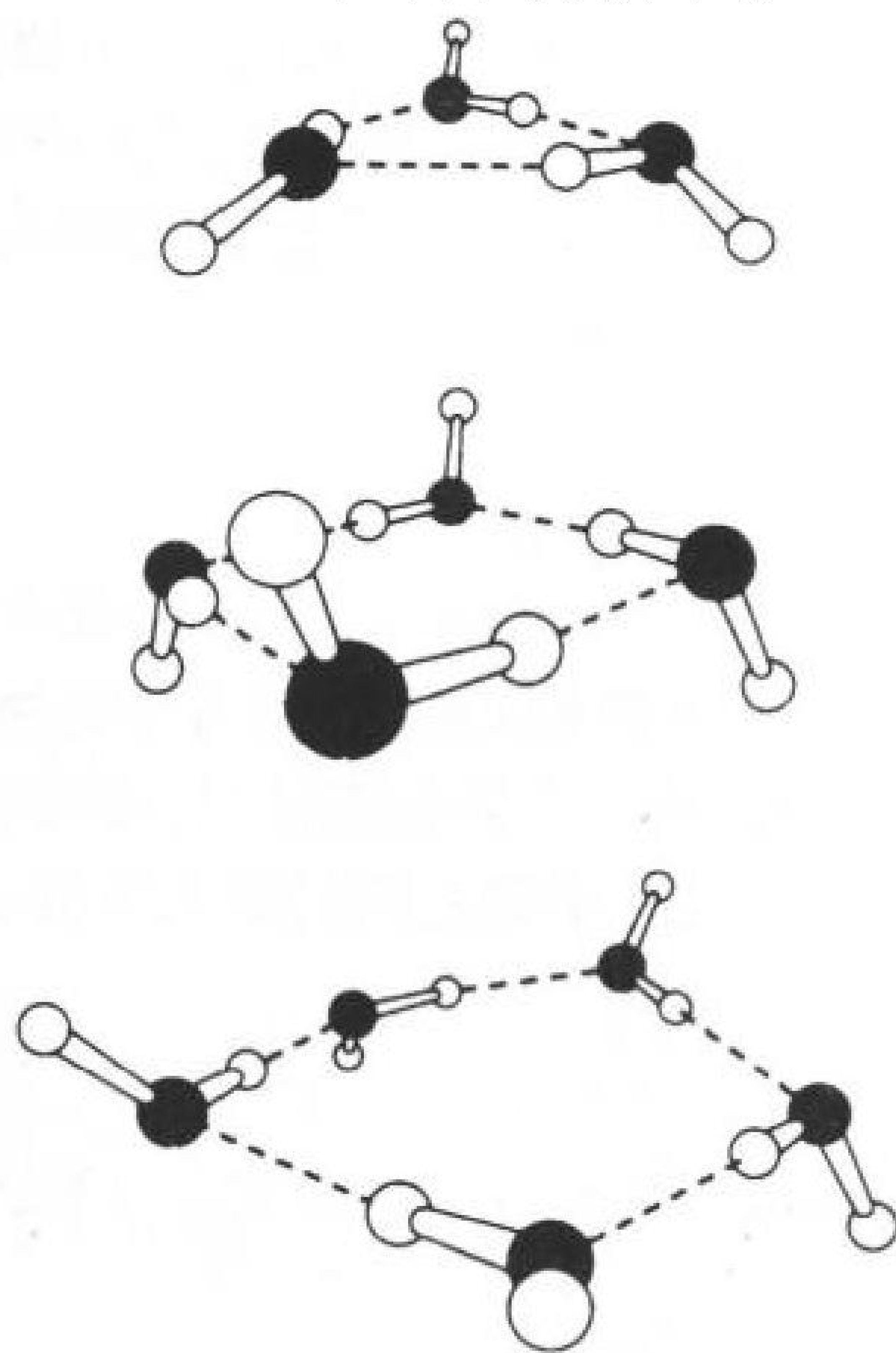


图 2-4 水的三聚体、四聚体和五聚体的结构

液态水结构的不规则性

因为每个液态水分子大约每 10^{-12}s 就重新定向一次,所以几乎没有实验技术能探索水分子的瞬时排列。理论思考和光谱学证据提示,与在冰中一样,每个液态水分子与四个最靠近的水分子氢键键合,但这些氢键是扭曲的,因此连结分子的网络是不规则的和可变的。例如,在液态水中普遍存在以氢键键合的水分子组成的 3~7 元环(图 2-4),而在冰中则是典型的 6 元环(图 2-3)。而且,每隔 2×10^{-11}s 这个网络就不断地被打破和重建。因此,*液态水是一个以氢键键合的水分子组成的快速波动的三维网络。*

生物分子中的氢键和其他弱相互作用

生物化学家不仅关心决定化学结构的强共价键,而且也关心在相对温和的物理条件下起作用的弱作用力。大多数生物分子的结构是由许多个别弱相互作用的加合影响所决定的。生物化学家感兴趣的弱静电力包括离子相互作用、氢键和范德华力。

相反电荷离子基团的结合强度取决于离子的性质、离子间的距离和介质的极性。一般来说,两个带电基团间相互作用的强度(即在感兴趣的介质中完全分开它们所需要的能量)小于共价键能,但大于氢键能(表 2-1)。

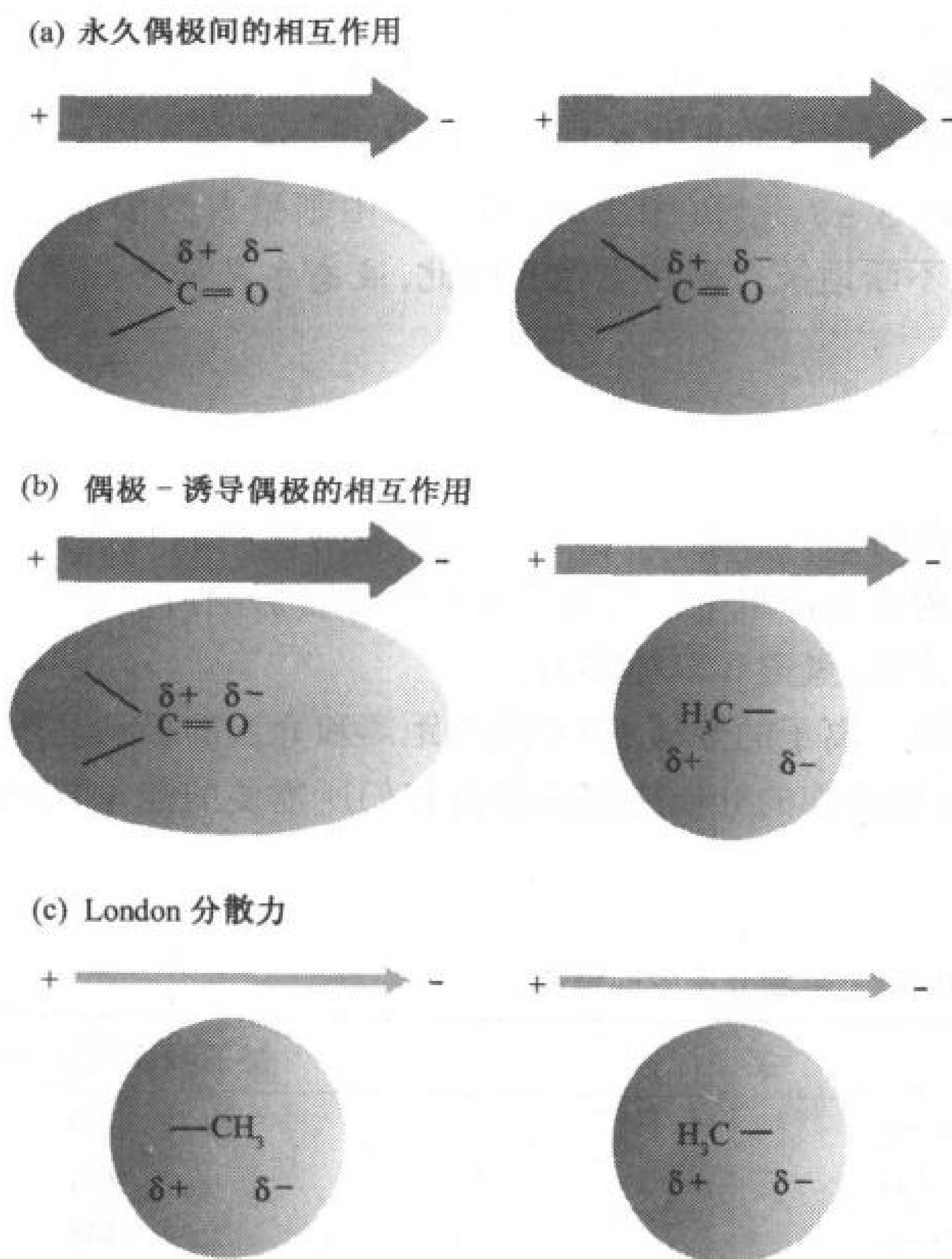
表 2-1 生物分子中的键能

键的类型	实 例	键的强度/(kJ·mol^{-1})
共价键	O—H	460
	C—H	414
	C—C	348
非共价键		
离子相互作用	$—COO^{-}$ - - - $^{+}H_3N—$	86
氢键	—O—H - - - O<	20
范德华力		
偶极-偶极相互作用	>C=O - - - >C=O	9.3
London 分散力	H—C(H)(H)—H - - - H—C(H)(H)—	0.3

中性分子间的非共价结合,总称为**范德华力**(van der Waals force),来源于永久偶极或诱导偶极间的静电相互作用(氢键是一类特别的偶极间相互作用)。永久偶极如羰基(图 2-5a)之间的相互作用比离子相互作用弱很多。通过静电扭变其电子分布,一个永久偶极也可在其相邻基团中诱导出一个偶极距(图 2-5b)。这种偶极-诱导偶极相互作用,一般比偶极-偶极相互作用弱很多。

在任一瞬间,非极性分子因其电子的快速波动运动而产生一个小的、随机定向的偶极距。这种瞬时偶极距使相邻基团中的电子具有极性(图 2-5c),因此这些基团相互吸引。这些所谓的 **London 分散力**(London dispersion force)很弱,且随距离增加而迅速减小,因此它们只对紧密接触的基团才有意义。然而,它们在决定内部含有许多紧密堆积基团的生物分子的结构方面非常重

要。



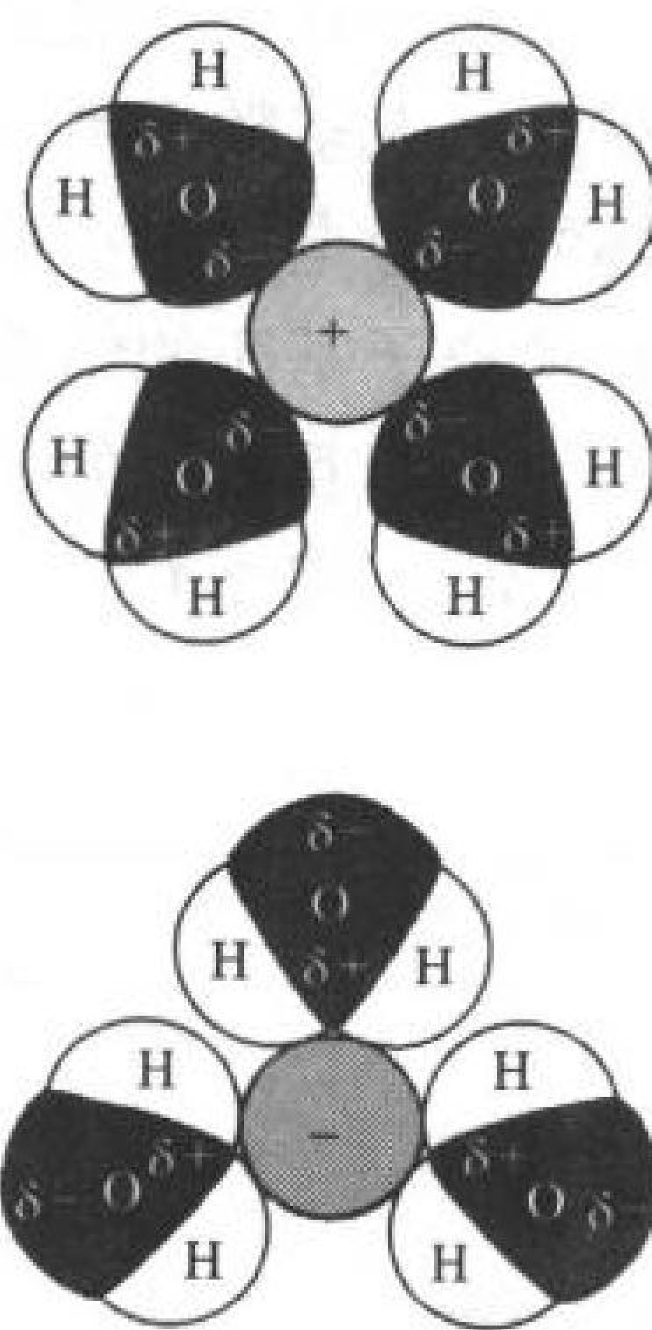


图 2-5　偶极-偶极相互作用

图 2-6　离子的溶剂化作用

B. 作为溶剂的水

溶解度取决于溶剂与溶质相互作用的能力，这比溶质颗粒间的相互作用更为强烈。水被称为“万能溶剂”，虽然这种说法照字义不可能是正确的，但是水确实比其他任何溶剂能溶解更多种类的物质，且溶解量更大。尤其是水的极性这一特点，使之成为极性物质和离子物质的极好溶剂，这些物质被称为**亲水的**(hydrophilic)(希腊文：hydro, water + philos, loving)。另一方面，非极性物质本质上不溶于水(油水不相混合)，所以称为**疏水的**(hydrophobic)(希腊文：phobos, fear)，但非极性物质可溶于非极性溶剂中，如 CCl_4 和己烷。这一点可用另一谚语来概括：相似相溶。

盐为什么溶于水？像水这样的极性溶剂，削弱相反电荷离子间的相互吸引力，因而能使离子分开(在非极性溶剂中，电荷相反的离子互相强烈吸引，以致于结合形成固体)。浸在像水这样的极性溶剂中的离子，吸引溶剂偶极的带相反电荷的一端(图 2-6)，因此，离子被几层定向排列的溶剂分子的同心层所包围，这样的离子被称为**溶剂化的**(solvated)，当以水为溶剂时，则被称为**水合的**(hydrated)。

27

不带电荷的极性分子的键合偶极使之能溶于水溶液，其原因与离子物质溶于水相同。当带有官能团，如羟基(OH)、羰基(C═O)、羧基(COOH)和氨基(NH_2)时，极性和离子物质的溶解度增加，因为这些基团均可与水形成氢键(图 2-7)，事实上，水溶性的生物分子，如蛋白质、核酸和

碳水化合物中都充满了这类基团。相反,非极性物质缺乏氢键的供体和受体基团。

C. 疏水效应

当在水溶液中加入非极性物质时,它不溶解,反而被水排斥。水和疏水分子的接触减至最小的倾向被称为**疏水效应**(hydrophobic effect)。许多大分子和分子聚合物,如蛋白质和细胞膜根据疏水效应确定其形状。

考虑将非极性分子从水溶液转移到非极性溶剂中的热力学,在所有情况下,自由能变化均为负值,这表明这种转移为自发过程(表2-2)。有趣的是,转移过程中或吸热(ΔH 为正值),或无热($\Delta H = 0$),这意味着非极性分子溶于水和溶于非极性介质中在热焓上或多或少同样有利。相反,在所有情况下,熵(以下用 $-T\Delta S$ 表示)的变化都很大且都是负值。显然,将碳氢化合物从水溶液转移到非极性介质中是熵驱动的(即自由能的变化大多归因于熵的变化)。

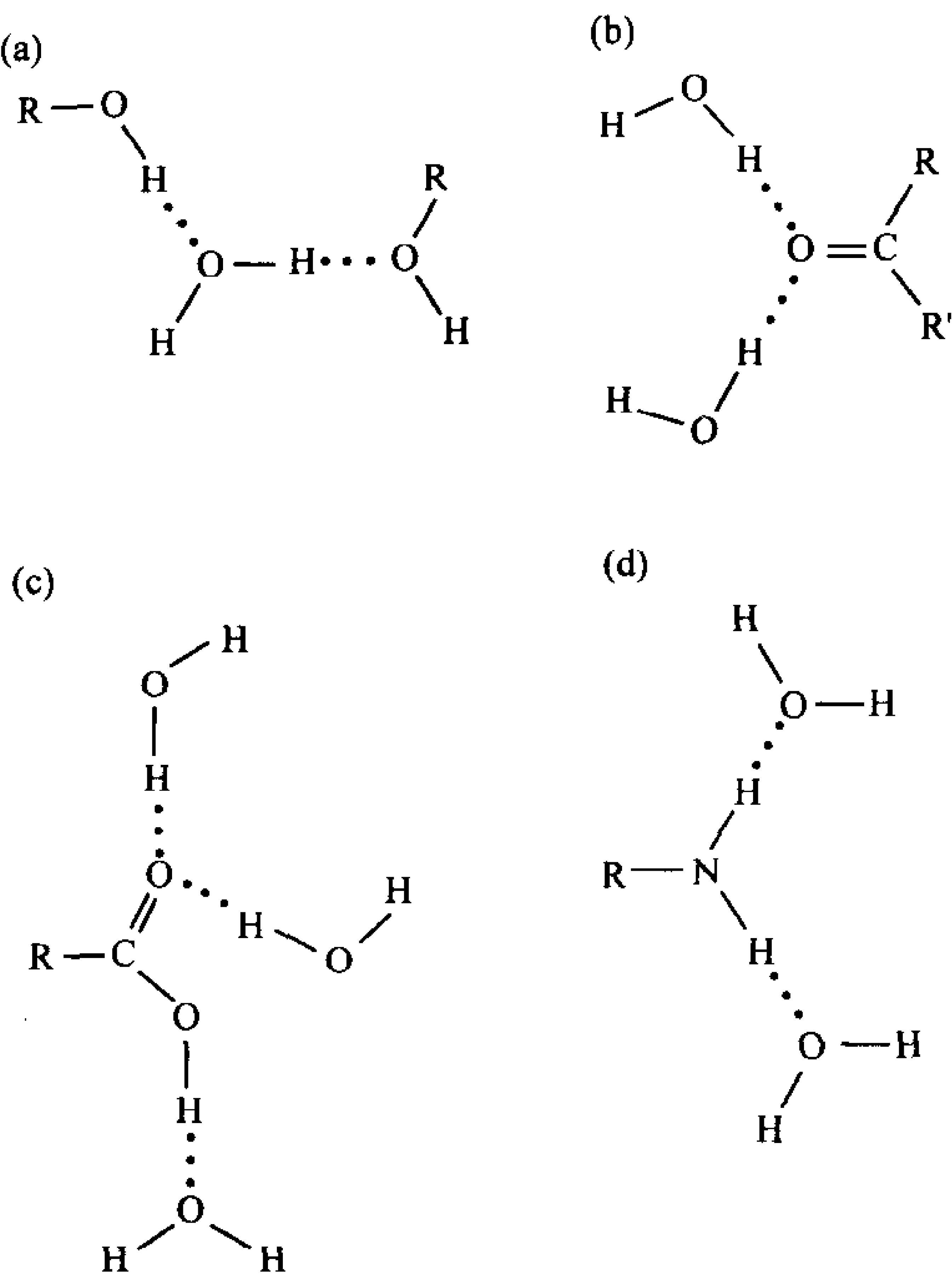


图2-7 官能团形成的氢键

表2-2 在25℃,将烃从水中转移到非极性溶剂中的热力学变化

过程	ΔH /(kJ·mol^{-1})	$-T\Delta S$ /(kJ·mol^{-1})	ΔG /(kJ·mol^{-1})
CH_4 在水中⇌CH_4 在 C_6H_6 中	11.7	−22.6	−10.9
CH_4 在水中⇌CH_4 在 CCl_4 中	10.5	−22.6	−12.1
C_2H_6 在水中⇌C_2H_6 在苯中	9.2	−25.1	−15.9
C_2H_4 在水中⇌C_2H_4 在苯中	6.7	−18.8	−12.1
C_2H_2 在水中⇌C_2H_2 在苯中[a]	0.8	−8.8	−8.0
苯在水中⇌液态苯	0.0	−17.2	−17.2
甲苯在水中⇌液态甲苯[a]	0.0	−20.0	−20.0

[a] 在18℃测定的数据。

[引自 Kauzmann, W., *Adv. Protein Chem*. 14, 39(1959)]

熵,或称"无序性",是一个系统的有序性量度(节1-4B)。如果非极性分子离开水溶液时熵增加了,则该分子进入水中时熵必定减少。非极性分子被水溶剂化时熵减少是实验观察的结果,而不是理论上的结论。然而,熵的变化太大,以至于不能仅反映碳氢化合物构象的变化。因此,熵的变化必定主要由水本身的某种有序化引起。这种有序化的本质是什么呢?

28

液态水分子的广泛的氢键网络被非极性基团的入侵打破。非极性基团既不能接受也不能提

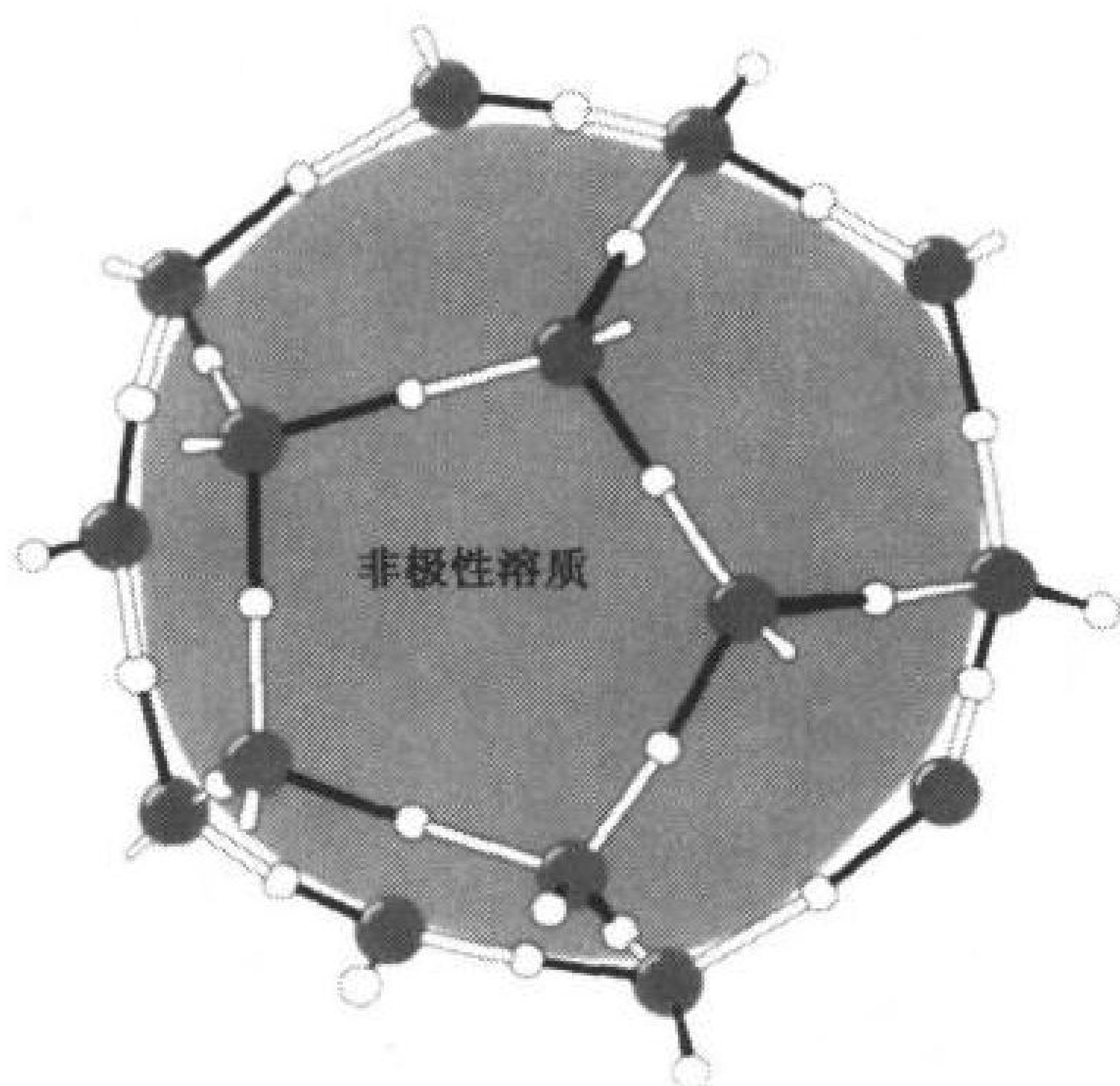


图 2-8 非极性溶质周围水分子的定向

供氢键，因此，在被非极性基团占据了的腔表面的水分子，不能按通常的方式与其他水分子形成氢键。为了恢复失去的氢键能，这些表面水分子自我定向形成以氢键键合的网络，将腔包围起来(图 2-8)。因为水分子在非极性基团表面形成氢键的数目少于在大量水中形成氢键的数目，因此这种定向构成水结构的一种有序化。

遗憾的是，液态水基本结构的复杂性使我们仍无法详细描述这种有序化的过程。一种模型提出，水在非极性基团周围形成冰样氢键"笼"，形成笼的水分子四面体性与其他水分子氢键键合。有序化的水分子在非极性溶质的第一水合层外又延伸出数层。

围绕非极性物质的水分子的有序化，导致非极性物质不利的水合自由能，其最终结果是非极性物质趋向于被水相排斥。这是因为含有非极性分子聚集的腔的表面积小于每个分子单独占有的腔的表面积之和。因此，非极性基团的聚集使得腔的表面积减少至最小，因而整个系统损失的熵最小。从这个意义上说，非极性基团被挤出了水相。

两亲性分子形成分子束和双分子层

大多数生物分子有极性(或带电荷)和非极性部分，因而同时既亲水又疏水。这样的分子，如脂肪酸离子(肥皂，图 2-9)，被称为**两亲性**(amphiphilic 或 amphipathic)(希腊文：amphi, both; pathos, passion)。两亲性分子与水溶剂如何相互作用呢？水倾向于水合亲水脂分子的亲水部分，但也倾向于排斥其疏水部分，结果亲水脂分子倾向于形成结构有序的聚合物。例如，**分子束**(micelle)是数千个亲水脂分子形成的小球，小球表面的亲水基团能与水溶剂相互作用，而疏水基团聚集在中央，远离溶剂(图 2-10a)。或者，亲水脂分子自身形成**双分子层**(bilayered)或双分子小泡，其中极性基团面对水相(图 2-10b)。在这两种形式中，聚合物都通过疏水效应，即水排斥疏水基团的倾向，而得以稳定。

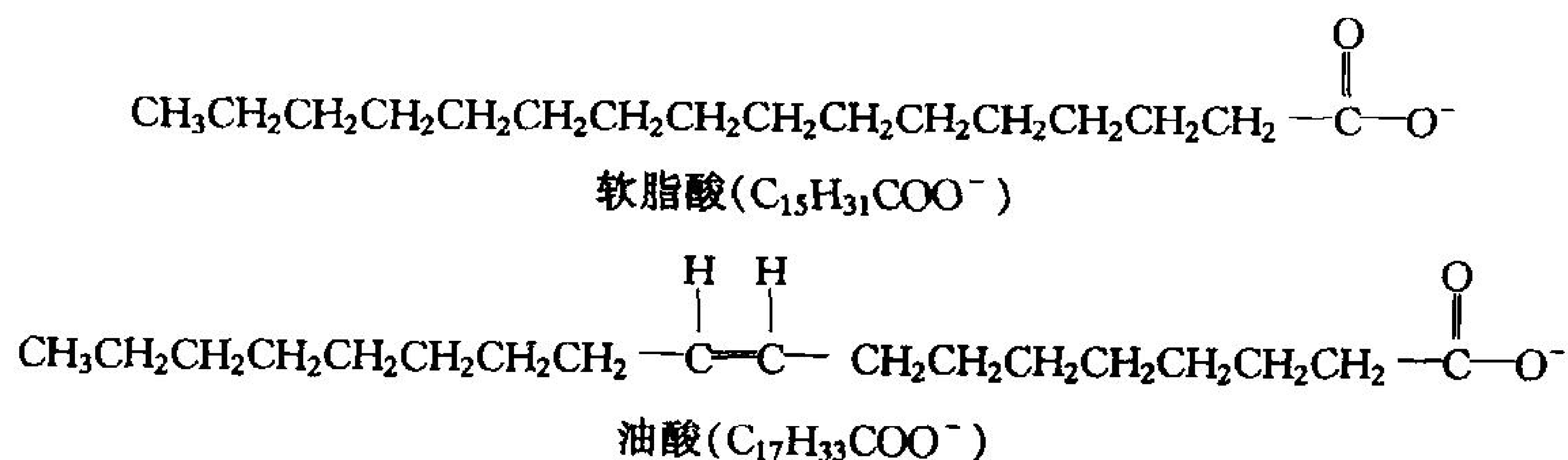


图 2-9 脂肪酸阴离子(肥皂)

疏水效应的结果通常被称为疏水力或疏水"键"。可是，"键"这一名词暗示着两个实体间有方向性的不连续关系。疏水效应间接作用于非极性基团，且缺乏方向性。尽管把非极性基团集合相互吸引的倾向归因于水的排斥，但是排斥主要是周围水分子熵的作用，而不是它们之间的

29

"疏水力"。

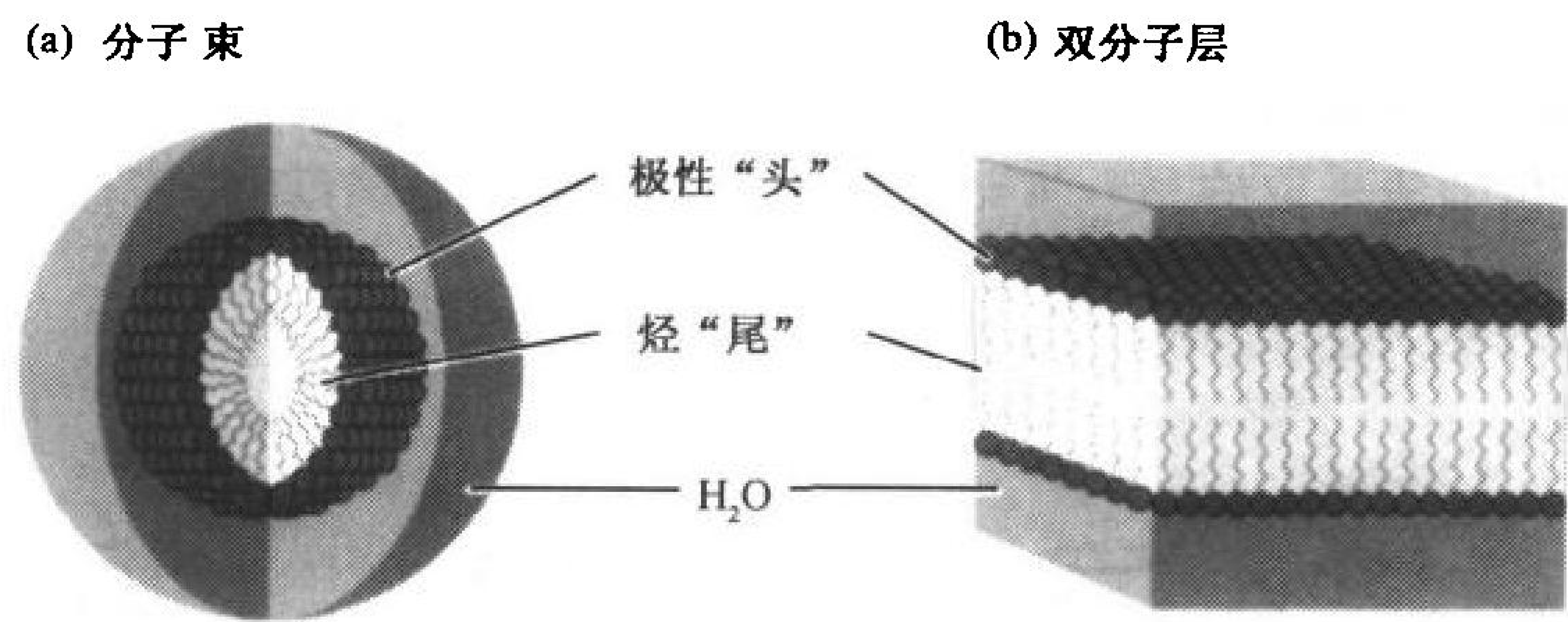


图 2-10 分子束和双分子层的结构

D. 渗透和扩散

古生物学家相信最初的生物来自富含营养的水,即所谓的原始汤。事实上,浸润我们体内细胞的液体其组成与海水有一些相似(表 2-3)。因此,我们含水的内部与纯水非常不同:在多细胞生物中,细胞内和细胞外的液体含有大量的溶解物质,从小的无机离子到很大的分子聚集物。而且,这些物质运动和碰撞发生在"自由水"中,这部分"自由水"的数量只占全部水量的一部分,因为每个溶解的分子都被一层相对不运动的水分子包围,称为**水合作用的水**(water of hydration)。

表 2-3 海水和细胞外液的离子组成

离 子	海水/($mmol \cdot L^{-1}$)	细胞外液/($mmol \cdot L^{-1}$)
Na^+	468	145
Mg^{2+}	53	1.5
Ca^{2+}	10	2.5
K^+	10	4
Cl^-	550	115
HPO_4^{2-}	0.001	2
SO_4^{2-}	28	1
HCO_3^-	2.3	30

此外,溶质的浓度影响水的**依数性**(colligative property),这些物理性质依赖于已溶解物质的浓度而不是它们的化学特性。例如,溶质使水分子更难结成冰,或者更难逃脱溶液进入气相,从而降低水的冰点或者升高水的沸点。

渗透压也依赖于溶质的浓度。当用只允许水分子通过,而不允许溶质通过的半透膜将一种溶液与纯水隔开时,水趋向于向溶液中移动,以使膜两侧的浓度相当。**渗透**(osmosis)是溶剂从高浓度区域(这是指纯水)向相对低浓度区域(含已溶解溶质的水)的运动。溶液的**渗透压**(osmotic pressure)是阻止水内流而需施加于溶液的压力,它与溶质的浓度成正比(图 2-11)。

$1\text{mol}\cdot L^{-1}$的溶液其渗透压为 22.4atm(标准大气压,$1\text{atm} = 1.013 \times 10^5\text{Pa}$)。对活细胞渗透压含义的考虑是:细胞本质上是水溶液的半透囊。许多动物细胞为使水的渗透流入量(这将使相对易破的细胞膜胀破)最小,采取的一种策略是使细胞周围溶液具有相似的渗透压(这样就没有水的净流);大部分植物和细菌采取的另一策略是用坚硬的细胞壁包裹细胞,这样就可以抵抗内部的渗透压。

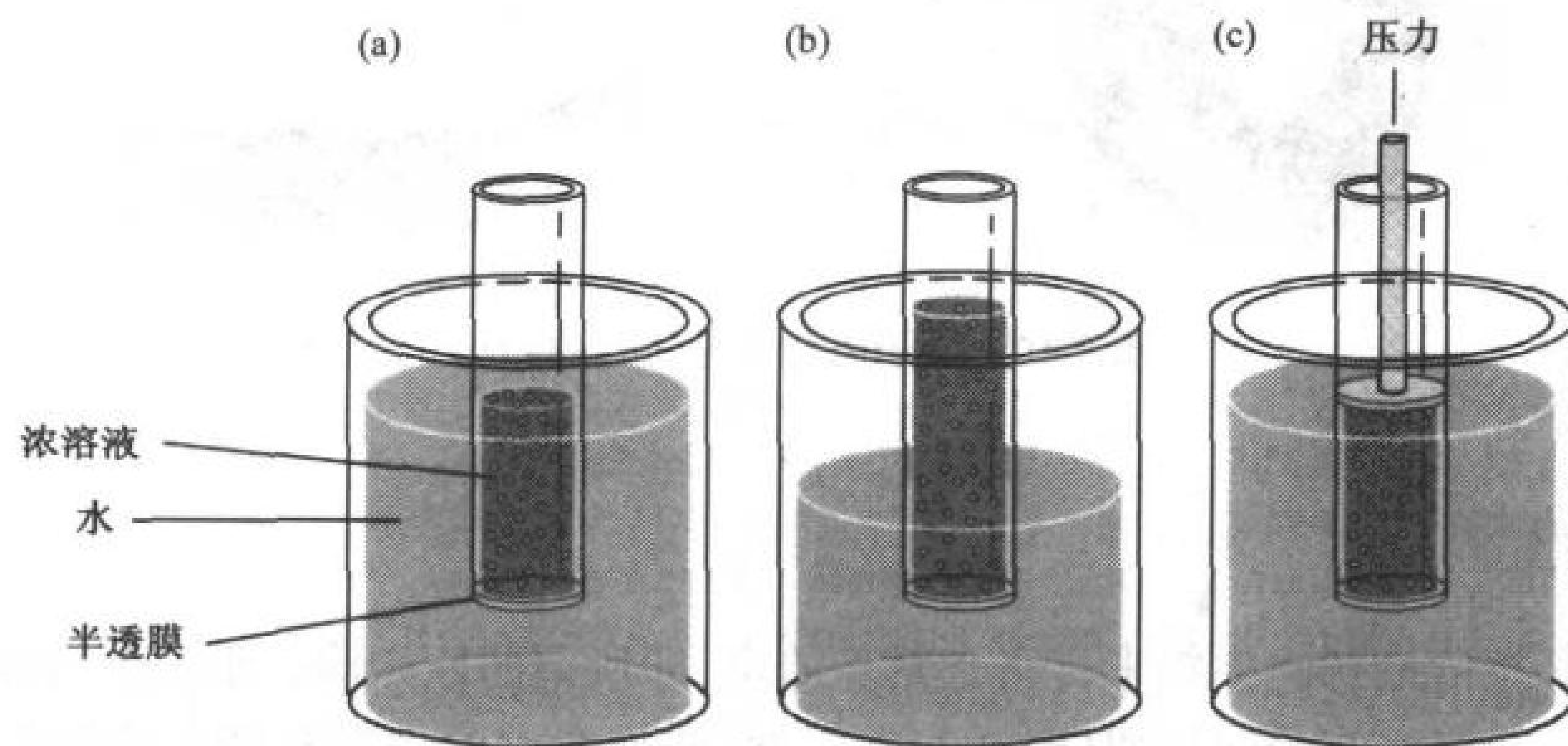


图 2-11 渗透压

当用水和溶质均可以通过的膜隔开水溶液与纯水时,与水向内移动一样,溶质向水溶液外移动。分子随机移动,即**扩散**(diffuse),直到膜两侧的溶质浓度相等为止,就此建立起平衡,也就是说再也没有水或溶质的净流动(虽然分子继续运动和碰撞)。

溶质的扩散是实验室**透析**(dialysis)技术的基础。在透析过程中,小于透析膜孔的溶质可以在样品与大量溶液间自由交换,直到达到平衡(图 2-12)。较大的物质不能跨膜而留在原处,透析对于从小分子中分离大分子如蛋白质和核酸特别有效。并且因为可溶性微粒在样品与周围介质间自由运动,所以可以多次重复透析,用另一种溶液替换样品介质。

溶质从高浓度区域向低浓度区域(即低一个浓度梯度)扩散的趋势在热力学上是有利的,因

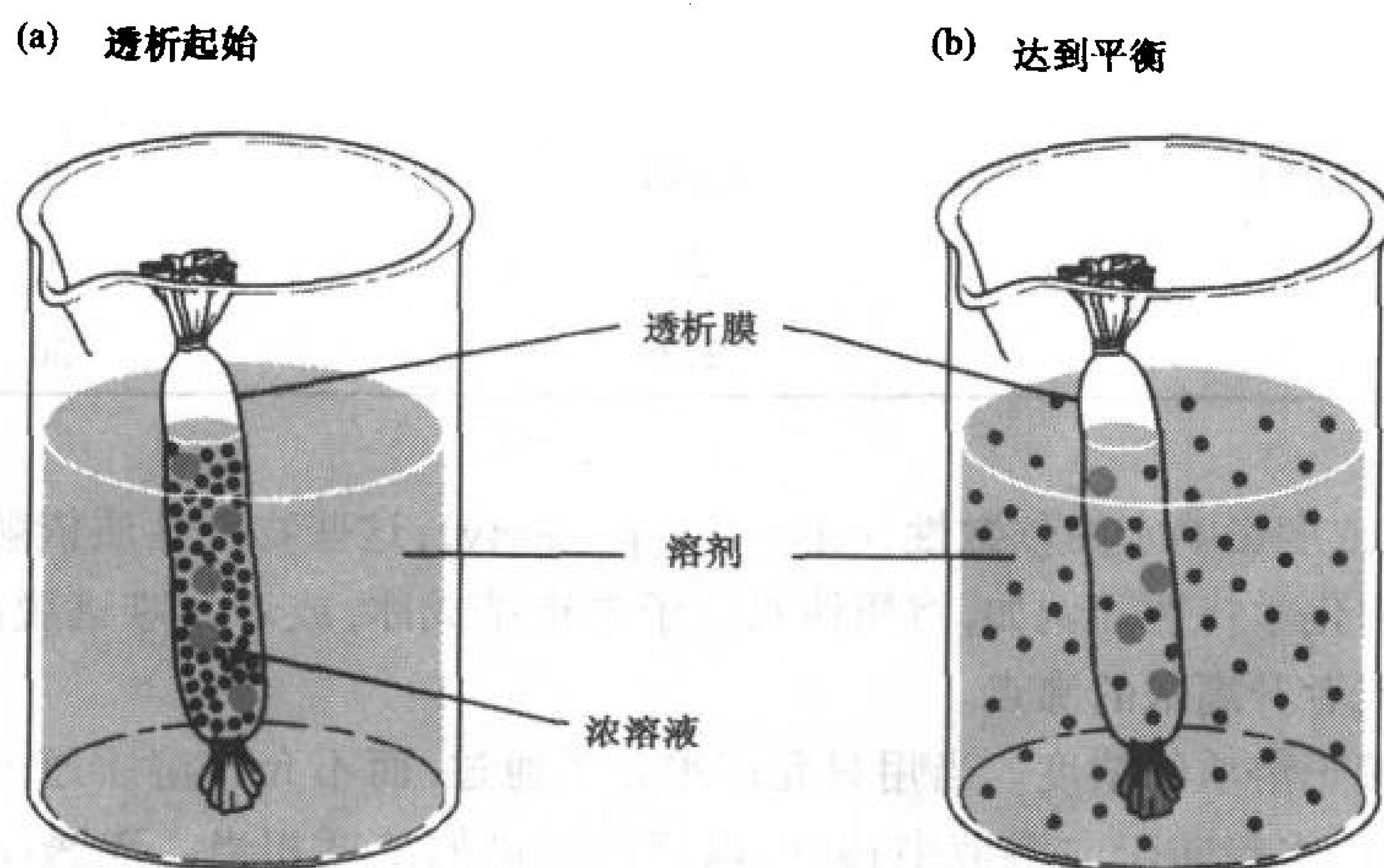


图 2-12 透析

为伴随着熵的增加。然而,微粒随机运动的结果——扩散,确实受到制约(见框 2-1)。例如,提高介质黏度可降低扩散率。而且,因为扩散是一种随机过程,所以扩散率随扩散距离的平方而变化。因此,若一个微粒平均 1s 内扩散 1cm,那么同一微粒扩散 10cm 则需要 100s。

框 2-1 生物化学相关内容

扩散率与生物机体的大小

小的生物机体靠扩散获取营养并排除废物。但是只有当表面积(与周围进行交换之处)与内部体积之比相当大时,扩散才是有效的。任何固体的表面积与其长度的平方成正比,而其体积与长度的立方成正比。

固体	表面积	体积	表面积/体积
立方体	$6l^2$	l^3	$6/l$
圆柱体	$2\pi rh+2\pi r^2$	πr^2h	$2/r+2/h$
球体	$4\pi r^2$	$4/3\pi r^3$	$3/r$

因此,一个大的物体与同样形状的小物体相比,其相对于体积的表面积较小。虽然生物的大小跨越了 8 个数量级,但是生命的基本单位——细胞的直径只有大约 1000 倍的变化,这并不令人惊奇。显然,在进化的历史过程中某一水平的组织被保留下来。

在多细胞生物中,形状与功能的分化有助于克服表面积与体积比的问题。在进行气体交换和营养吸收之处,如腮、肺和肠,其微观结构的特征是具有巨大的表面积。例如,人的肺具有 $50\sim100m^2$ 的表面积,在约 3 亿个肺泡(小囊)里共含有约 6L 的空气量。而且,只有在最小尺寸不大于约 1mm 的生物机体中,养料和废物的扩散率才足够高到能维持生命。较大的生物机体需要一种循环系统,如血液,将物质从产生或吸收之处活跃地运输到利用或消耗之处。

2. 水的化学性质

水不仅仅是细胞或胞外环境的被动成分。由于其物理性质,决定了其他物质的溶解度;同样,水的化学性质决定了溶液中其他分子的行为。

A. 水的电离

水是一种有微弱电离倾向的中性分子,我们通常将其电离表示为:



$$H_2O \rightleftharpoons H^+ + OH^-$$

溶液中实际上不存在自由的质子(H^+);相反,质子与一个水分子结合形成**水合氢离子**(hydironium ion):H_3O^+。质子还可与水分子簇结合生成结构式为 $H_5O_2^+$、$H_7O_3^+$ 等结构。然而,为了简便,我们都用 H^+ 来表示这些离子。

一定的水合氢离子的质子,可以从一个水分子快速跳跃到另一个水分子上(图 2-13)。因此,H^+ 和 OH^- 的流动性比其他离子大得多。酸碱反应是水溶液中发生的最快的反应之一,**质子跳跃**(proton jumping)也是这一观测结果的主要原因。

水的电离可以用平衡式来描述,其中亲代物质的浓度为分母,离解产物的浓度为分子。

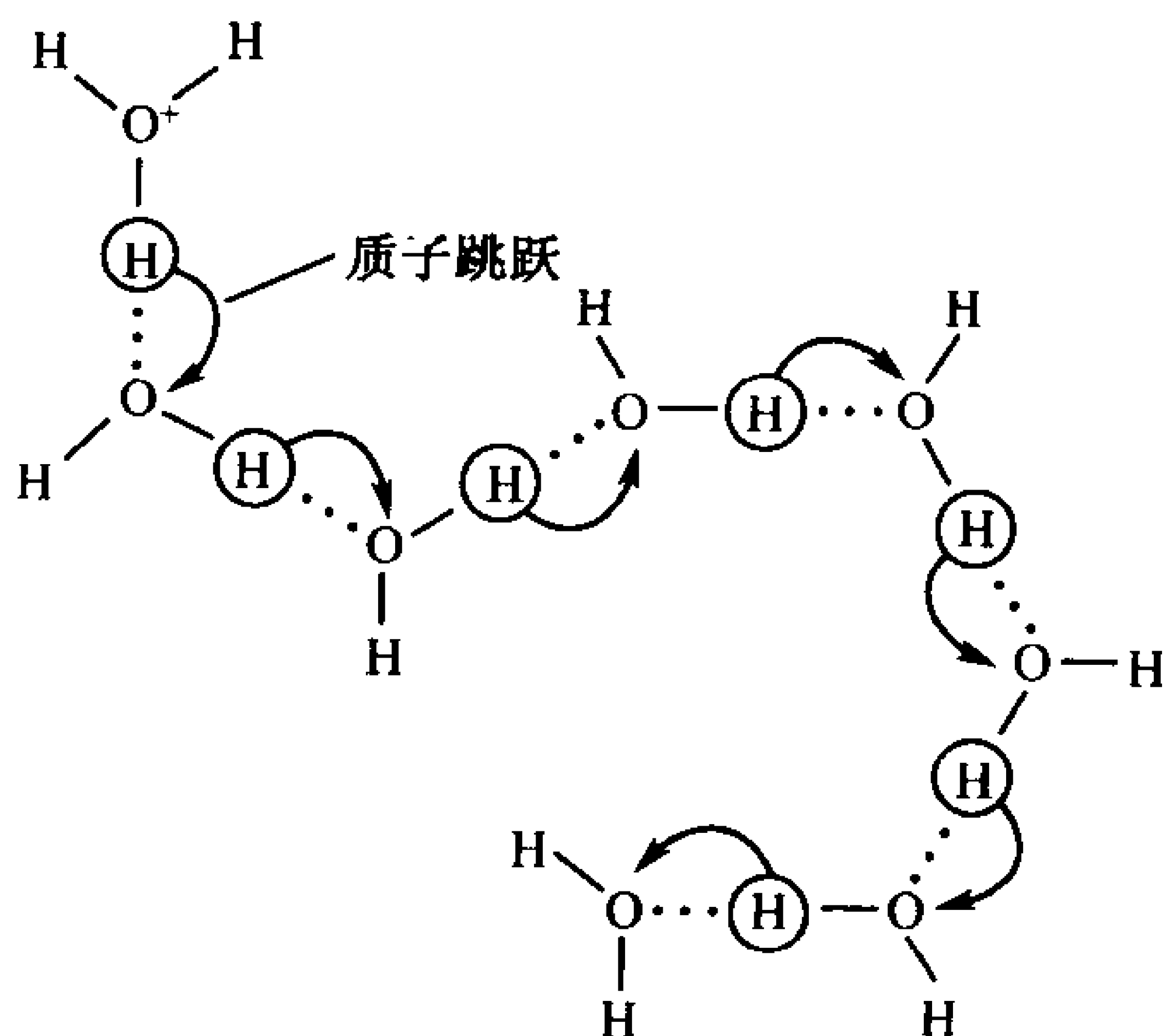


图 2-13 质子跳跃

$$K = \frac{[H^+][OH^-]}{[H_2O]} \qquad [2-1]$$

K 是**解离常数**(dissociation constant)(从这里起，本书用方括号表示物质的摩尔浓度)。因为不解离的 H_2O 的浓度$[H_2O]$远大于其组成离子的浓度，所以可以认为$[H_2O]$是不变的，且可不包括在 K 中，因此产生水电离的表达式为：

$$K_w = [H^+][OH^-] \qquad [2-2]$$

K_w 是水的电离常数，在 25℃ 时为 $10^{-14}mol \cdot L^{-1}$。

纯水中的 H^+ 和 OH^- 是等摩尔浓度的，所以$[H^+] = [OH^-] = (K_w)^{1/2} = 10^{-7}mol \cdot L^{-1}$。由等式[2-2]可知，$[H^+]$和$[OH^-]$互为倒数关系，所以当$[H^+]$大于 $10^{-7}mol \cdot L^{-1}$时，$[OH^-]$一定相应地减少，反之亦然。$[H^+] = 10^{-7}mol \cdot L^{-1}$的溶液称为**中性的**(neutral)；$[H^+] > 10^{-7}mol \cdot L^{-1}$的溶液称为**酸性的**(acidic)；而$[H^+] < 10^{-7}mol \cdot L^{-1}$的溶液称为**碱性的**(basic)。大多数生理溶液的氢离子浓度均接近于中性，例如，人血液的$[H^+] = 4.0 \times 10^{-8}mol \cdot L^{-1}$，正常呈微碱性。

大多数溶液的$[H^+]$值都很小，难以互相比较。1909 年，Søren Sørenson 设计了一个更加可行的量，被称为 **pH**：

$$pH = -\lg[H^+] \qquad [2-3]$$

pH 越高，H^+ 浓度就越低；pH 越低，H^+ 浓度就越高(图 2-14)。纯水的 pH 为 7.0；酸性溶液的 pH 小于 7.0；而碱性溶液的 pH 均大于 7.0。注意，相差 1 个 pH 单位的溶液$[H^+]$是 10 倍的关系。表 2-4 给出一些常用物质的 pH 值。

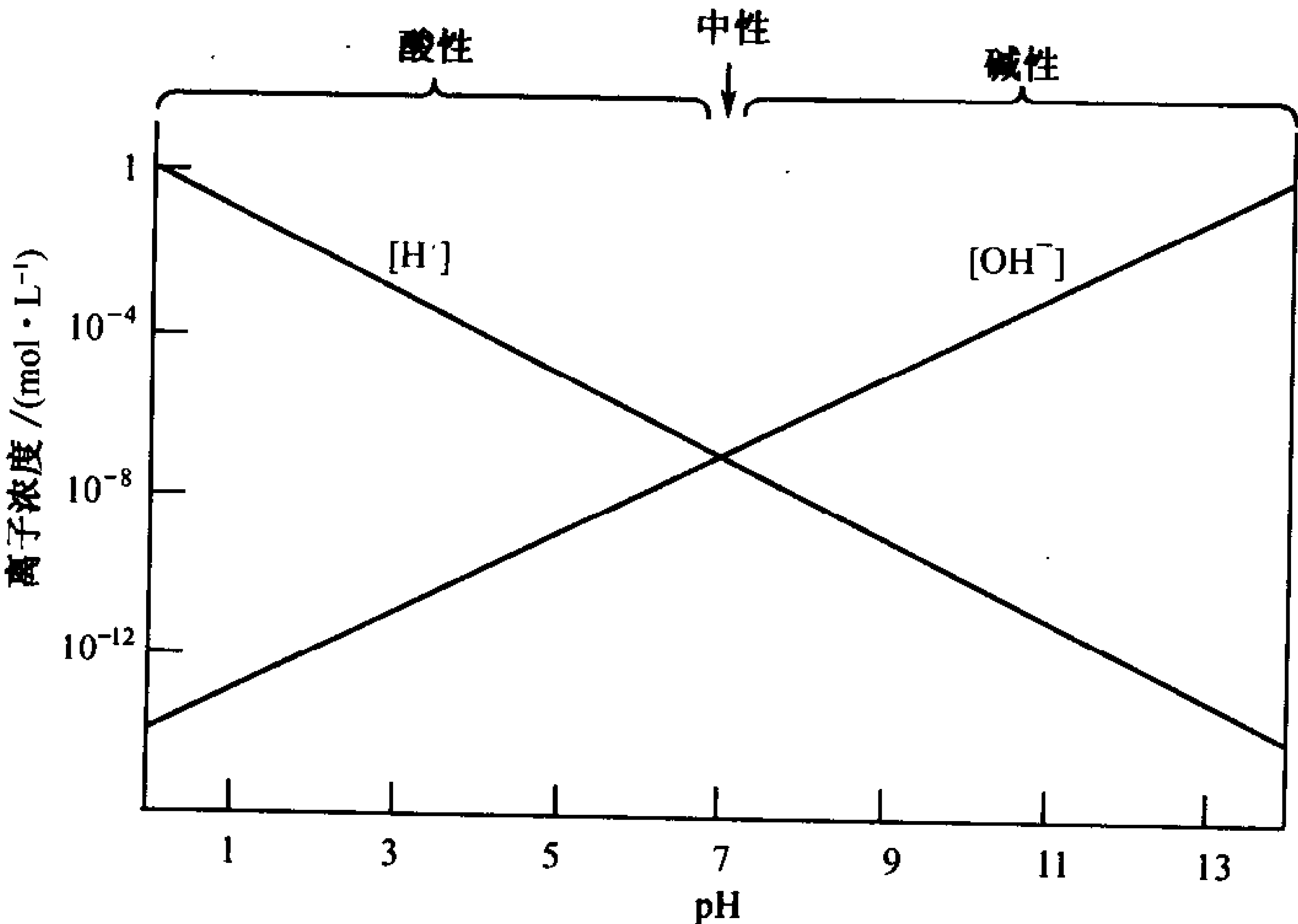


图 2-14 水中 H^+ 和 OH^- 的浓度与 pH 的关系

表 2-4 一些常用物质的 pH 值

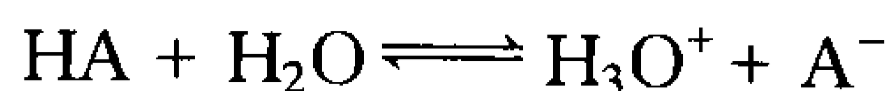
物质	pH
$1mol \cdot L^{-1}$ NaOH	14
家用氨水	12
海水	8
血液	7.4
牛奶	7
唾液	6.6
番茄汁	4.4
醋	3
胃液	1.5
$1mol \cdot L^{-1}$ HCl	0

B. 酸-碱化学

从水中衍生出的 H^+ 和 OH^-，是本书在以后章节中要涉及到的生化反应的基础。生物分子，如蛋白质和核酸，都含有大量的作为酸或碱的功能基团，例如羧基和氨基基团。这些分子影响周围水介质的 pH；而它们自己的结构和活性反过来又受周围 pH 的影响。因此，正确理解酸-碱化学，对了解许多分子的生物学功能是必要的。

酸能够提供质子

根据 19 世纪 80 年代 Svante Arrhenius 提出的定义：**酸**（acid）是能够提供质子的物质，而**碱**（base）则是能够提供氢氧根离子的物质。这个定义有相当大的局限性，例如，它无法解释呈碱性的 NH_3 并无 OH 基团。1923 年，Johannes Brϕnsted 和 Thomas Lowry 提出了一个更广义的定义：*酸是能够提供质子的物质（同 Arrhenius 的定义），而碱是能够接受质子的物质*。根据 Brϕnsted-Lowry 的定义，酸-碱反应可写为：



$$HA + H_2O \rightleftharpoons H_3O^+ + A^-$$

酸（HA）与碱（H_2O）反应形成酸的**共轭碱**（A^-）（conjugate base）和碱的**共轭酸**（H_3O^+）（conjugate acid）。因此，乙酸根离子（CH_3COO^-）是乙酸（CH_3COOH）的共轭碱；铵离子（NH_4^+）是氨（NH_3）的共轭酸。省略其中的 H_2O，酸-碱反应通常简写为：$HA \rightleftharpoons H^+ + A^-$。

33

用解离常数决定酸的强度

酸-碱反应的平衡常数是用解离常数来表示的，分母是反应物的浓度，分子是产物的浓度：

$$K = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA][H_2O]} \qquad [2\text{-}4]$$

在稀溶液中，水的平衡解离常数为 $55.5 mol \cdot L^{-1}$（$1000 g \cdot L^{-1}/18.015 g \cdot mol^{-1} = 55.5\ mol \cdot L^{-1}$），所以，通常把 $[H_2O]$ 与解离常数结合在一起，得出等式：

$$K_a = K[H_2O] = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \qquad [2\text{-}5]$$

可是，为了简便，我们以后将省略下标 a。

一些常用酸的解离常数列于表 2-5 中。和 $[H^+]$ 值一样，酸的解离常数有时不便于实际应用，所以也用类似于等式[2-3]的方法将其转变为 **p*K***。

$$pK = -\lg K \qquad [2\text{-}6]$$

根据酸的相对强度，即它们将质子传递给 H_2O 的能力，对酸进行分类。表 2-5 中所列的酸都是**弱酸**（weak acid），因为它们在水溶液中仅部分解离（$K<1$）。许多所谓的无机酸，如高氯酸、硝酸和盐酸都是**强酸**（strong acid）（$K \gg 1$）。强酸可以迅速地将它们所有的质子都传递给 H_2O，*所以在水溶液中稳定存在的最强的酸是 H_3O^+*。同样，*水溶液中的最强的碱非 OH^- 莫属*。事实上，生物系统中发生的所有酸-碱反应都包含 H_3O^+（和 OH^-）以及弱酸（和它们的共轭碱）。

34

表 2-5 在 25℃某些酸的解离常数和 pK 值

酸	K	pK
草酸	5.37×10^{-2}	1.27(pK_1)
H_3PO_4	7.08×10^{-3}	2.15(pK_1)
甲酸	1.78×10^{-4}	3.75
琥珀酸	6.17×10^{-5}	4.21(pK_1)
草酸根$^-$	5.37×10^{-5}	4.27(pK_2)
乙酸	1.74×10^{-5}	4.76
琥珀酸根$^-$	2.29×10^{-6}	5.64(pK_2)
α-(*N*-吗啉)乙基磺酸(MES)	8.13×10^{-7}	6.09
H_2CO_3	4.47×10^{-7}	6.35(pK_1)[a]
对二氮己环-*N*, *N'*-二(2-乙基磺酸)(PIPES)	1.74×10^{-7}	6.76
$H_2PO_4^-$	1.51×10^{-7}	6.82(pK_2)
3-(*N*-吗啉)丙烷磺酸(MOPS)	7.08×10^{-8}	7.15
N-2-羟乙基哌嗪-*N'*-2-乙基磺酸(HEPES)	3.39×10^{-8}	7.47
三(羟甲基)氨甲烷(Tris)	8.32×10^{-9}	8.08
NH_4^+	5.62×10^{-10}	9.25
甘氨酸	1.66×10^{-10}	9.78
HCO_3^-	4.68×10^{-11}	10.33(pK_2)
吡啶	7.58×10^{-12}	11.12
HPO_4^{2-}	4.17×10^{-13}	12.38(pK_3)

引自：Dawson, R. M. C., Elliott, D. C., Elliott, W. H., and Jones, K. M., *Data for Biochemical Research* (3rd ed.), pp. 424—425, Oxford Science Publications(1986) *and* Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S., and Singh, R. M. M., *Biochemistry* 5, 467(1966)。

[a] 总反应的 pK $CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$；见框 2-2。

酸和碱的相对浓度决定溶液的 pH

酸及其共轭碱的浓度与溶液的 pH 之间的关系可以容易地得出，式[2-5]可重排为：

$$[H^+] = K = \frac{[HA]}{[A^-]} \qquad [2\text{-}7]$$

两边各项取负对数(并使 pH = − lg [H$^+$]；等式[2-3])，得到：

$$pH = -\lg K + \lg\frac{[A^-]}{[HA]} \qquad [2\text{-}8]$$

用 pK 取代 − lg$K$，得到：

$$\boxed{pH = pK + \lg\frac{[A^-]}{[HA]}} \qquad [2\text{-}9]$$

这就是 **Henderson-Hasselbalch 方程**。当酸(HA)与其共轭碱[A$^-$]的摩尔浓度相等时，lg([A$^-$]/[HA]) = 0，溶液的 pH 在数值上等于该酸的 pK。Henderson-Hasselbalch 等式便于计算，例如含已知量的弱酸及其共轭碱溶液的 pH。但是，由于 Henderson-Hasselbalch 等式不能诠释水本身的电离，所以无法用来计算强酸和强碱的 pH。例如 1mol·L^{-1}强酸溶液的 pH 为 0，1mol·L^{-1}强碱溶液的 pH 为 14。

实例计算

计算2L含有10ml 5mol·L^{-1}乙酸和10ml 1mol·L^{-1}乙酸钠溶液的pH。

首先计算酸和共轭碱的浓度，所有浓度单位均以克分子每L表示。

乙酸：(0.01L)(5mol·L^{-1})(2L) = 0.025mol·L^{-1}

乙酸钠：(0.01L)(1mol·L^{-1})(2L) = 0.005mol·L^{-1}

将酸和其共轭碱的浓度代入Henderson-Hasselbalch方程中，从表2-5中可以找到乙酸的pK值。

pH = pK + lg([乙酸盐]/[乙酸])

pH = 4.76 + lg(0.005/0.025)

pH = 4.76 − 0.70

pH = 4.06

C. 缓冲液

在1L纯水中加入一滴0.01ml的1mol·L^{-1} HCl，则使水的pH由7变为5，即[H^+]增加了100倍。因为即使是微小的pH变化，都能极大地影响生物分子的结构和功能，所以，如此大的

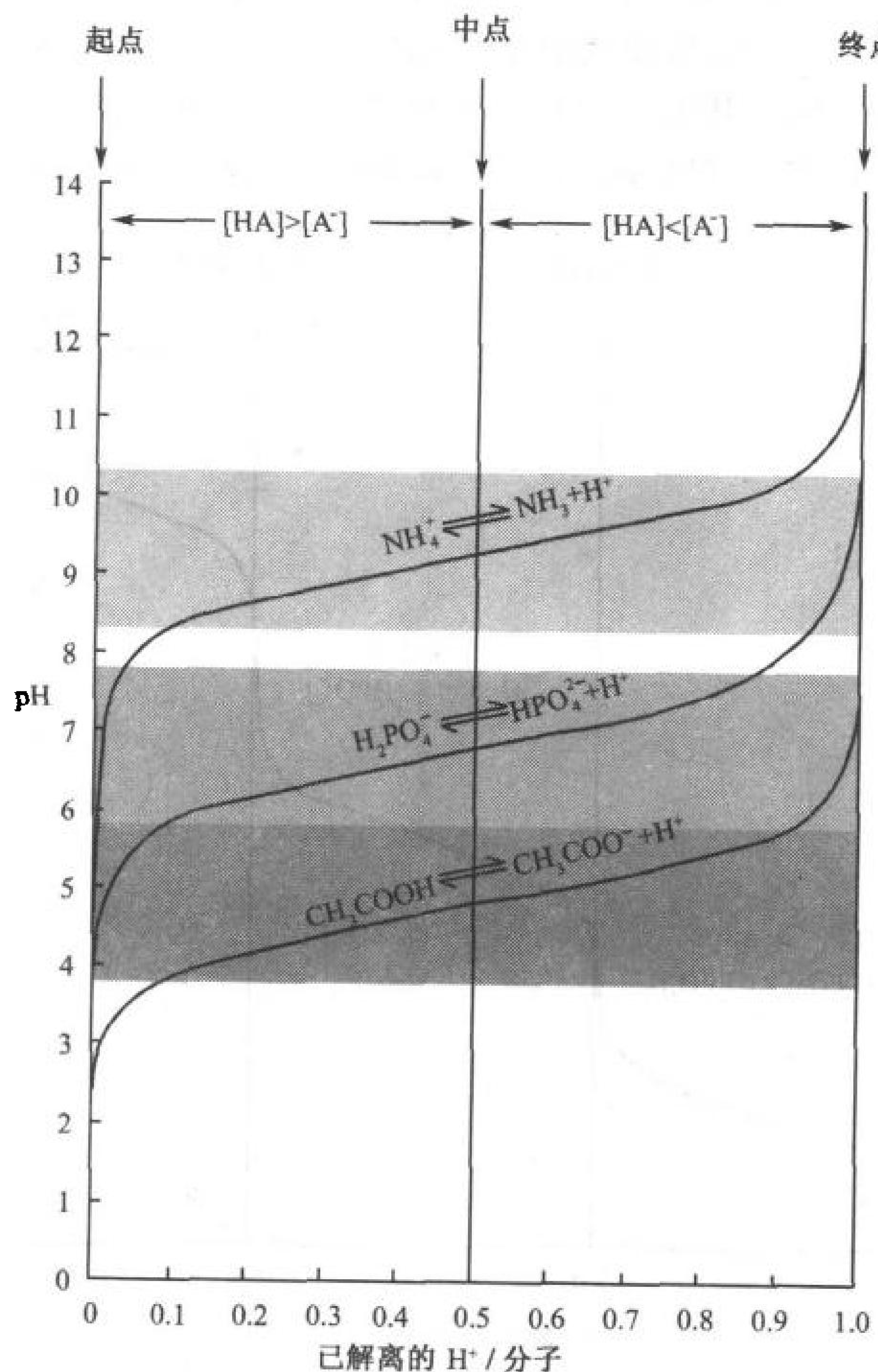


图2-15 乙酸、磷酸和氨的滴定曲线

pH变化对大多数生物系统而言是不能忍受的。因此,生命系统维持一个相对稳定的pH是至关重要的。为了理解这一点,考虑下面用强碱滴定弱酸的情况。

图2-15显示出乙酸、$H_2PO_4^-$和铵离子(NH_4^+)溶液的pH是如何随OH^-的加入而变化的。这类**滴定曲线**(titration curve)可通过实验观察,或用Henderson-Hasselbalch方程计算作出。当OH^-与HA反应时,产物是A^-和水。

应该注意图2-15中滴定曲线的一些细节:

1)图中曲线的形状类同,但沿pH轴在垂直方向上移动。

2)每条滴定曲线中点处的pH在数值上等于该酸的pK;在这一点上,[HA]=[A^-]。

3)每条滴定曲线靠近中点处的斜率远低于两翼处的斜率。这表明,当[HA]≈[A^-]时,溶液的pH对加入的强酸和强碱均不敏感。这样的溶液就称为酸-碱**缓冲液**(buffer),可以抵抗pH的变化,因为加入的少量H^+或OH^-分别与A^-或HA反应,lg([A^-]/[HA])值的变化很小。

不只一次解离的物质,如H_3PO_4和H_2CO_3,称为**多质子酸**(polyprotic acid)。多质子酸的滴定曲线比单质子酸如乙酸的滴定曲线要复杂。图2-16是H_3PO_4的滴定曲线,多质子酸具有多个pK,每个pK对应每一步的解离,例如,H_3PO_4有3个解离常数。因为质子解离产生的离子电荷静电性抑制质子的进一步解离,从而使相应的pK升高。与此类似,如果一个分子含有多个可解离基团,那么对应于每个解离基团均会有一个独立的pK。在含有许多可解离基团的生物分子中,这些可解离的基团具有不同的pK,许多解离反应可能产生无明显"平台"的滴定曲线。

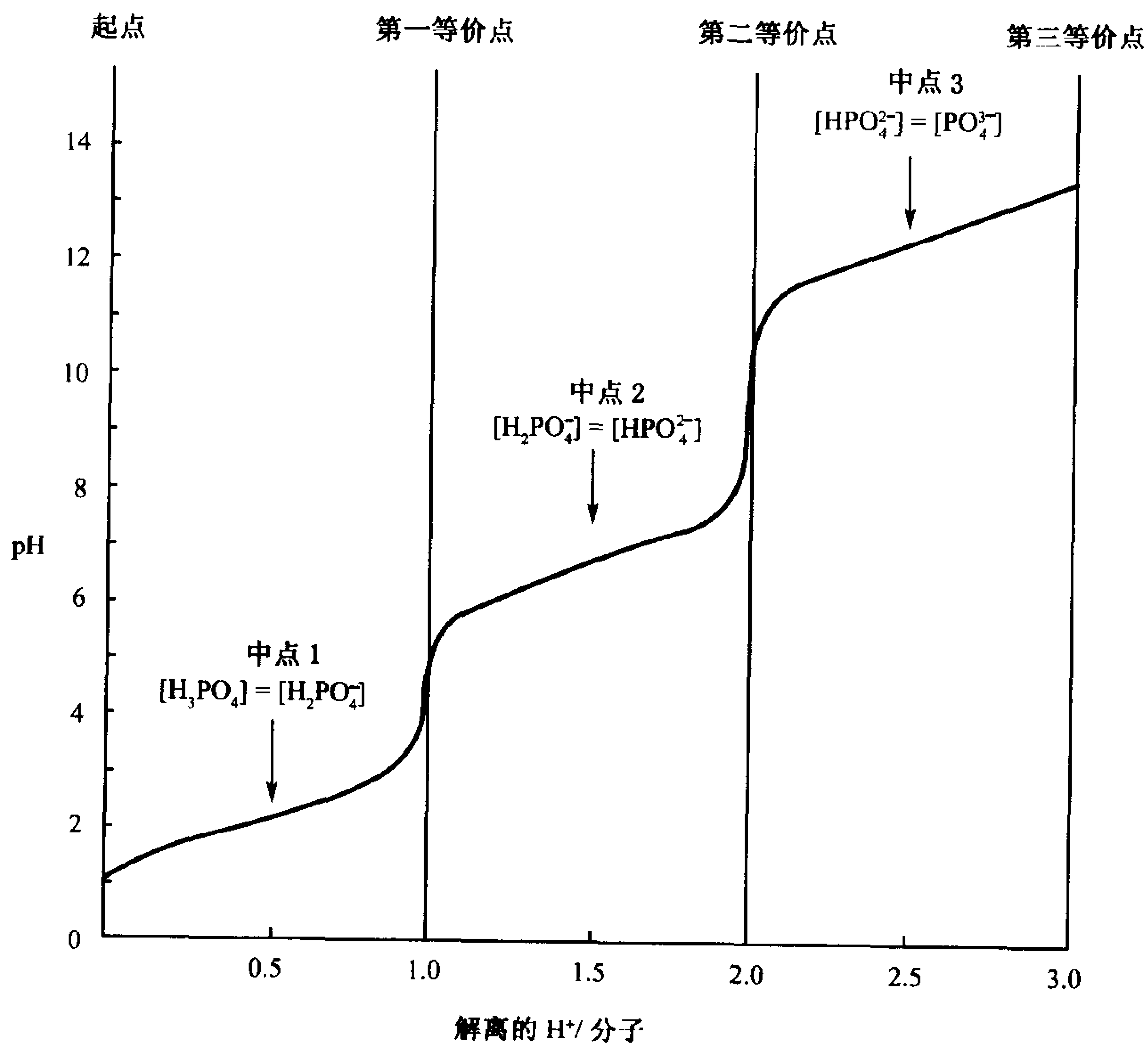


图2-16 多质子酸和滴定曲线

36

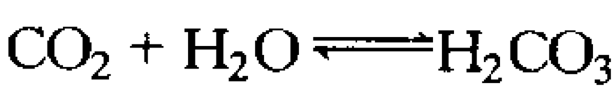
生物体液,无论是细胞内液,还是细胞外液,都具有高度缓冲性。例如,健康个体的血液被严格控制在 pH 7.4(见框 2-2)。因为磷酸根和碳酸根离子的 pK 处于这一范围内(表 2-5),所以它们成为大多数生物体液的重要缓冲剂。另外,蛋白质、核酸和脂类等生物分子,以及大量的有机小分子含有多个酸-碱基团,在生理 pH 范围内是有效的缓冲成分。

框 2-2 健康和疾病的生物化学

37

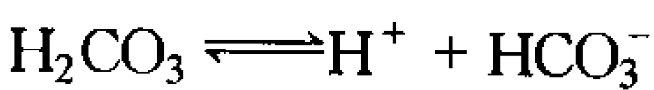
血液缓冲系统

碳酸氢盐是人血液中最重要的缓冲化合物,其他缓冲剂,包括蛋白质和有机酸,在血液中的浓度要低得多。血液的缓冲能力主要依赖于两种平衡:①溶于血液中的气态 CO_2 和由以下反应所生成的碳酸之间的平衡:



$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H_2CO_3$$

②碳酸和碳酸氢盐之间 H^+ 的解离平衡:



$$H_2CO_3 \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$$

这两个先后反应的总 pK 为 6.35(HCO_3^- 进一步解离为 CO_3^{2-},pK 为 10.33,在生理 pH 下没有意义)。

当血液中的 pH 因代谢产物 H^+ 的积累而下降时,碳酸氢盐-碳酸的平衡向生成更多碳酸的方向移动,同时碳酸脱水生成 CO_2,然后经由肺以气态 CO_2 的形式排出。反过来,当血液的 pH 上升时,HCO_3^- 的生成量相对增多,呼吸随之进行调整,以便使肺中增加的 CO_2 重新进入血液转变为碳酸。通过这种方式,血液中的氢离子浓度能够保持几乎不变。

血液缓冲系统的混乱会导致酸中毒(pH 低到 7.1)或碱中毒(pH 高到 7.6)(与正常值 7.4 的差异小于 0.05 个 pH 单位是不要紧的)。例如,阻塞性肺病,一种阻止 CO_2 有效呼出的疾病,会引起呼吸性酸中毒。过度换气,加速了 CO_2 的流失,会引起呼吸性碱中毒。由饮食中前体引起的有机酸过度生成,或者运动过程中乳酸水平的突然升高,都会导致代谢性酸中毒。

纠正存在的生理问题可以最好地缓解酸-碱不平衡。简言之,通常采用静脉注射 $NaHCO_3$ 来治疗酸中毒。碱中毒的治疗更困难,代谢性碱中毒有时对 KCl 或 NaCl 有效(增加的 Cl^- 有助于使肾脏分泌的 H^+ 降至最低)。呼吸性碱中毒可通过呼吸富含 CO_2 的空气而得到缓解。

20 世纪之前,人们未能充分认识这样的概念,即生物分子的性质随它们所溶溶液的酸度变化而改变。早期的许多生化实验都没有控制样品的酸度,结果重复性往往很差。现在,常规都用缓冲液来处理生化制品,以模拟天然存在的生物体液的性质。多种合成化合物已被开发用作缓冲剂,表 2-5 列出了其中的一部分。当 pH = pK 时,这些弱酸的**缓冲能力**(buffering capacity)(即在加入酸或碱时抵抗 pH 变化的能力)最大。弱酸 pK 值的上下 1 个 pH 单位范围,是它的有效缓冲范围(如图 2-15 中的阴影部分)。超出这一范围,即当 $[A^-]/[HA] > 10$ 时,随着强碱的加入,溶液的 pH 值会迅速改变。当 pK 大于 1 个 pH 单位时,随着强酸的加入,溶液也同样无法有效地缓冲。

在实验室中,所需缓冲液的 pH 决定了缓冲化合物的选择。典型情况是,这种化合物的酸和它的可溶性盐之一,按需要的克分子比例(几乎相等)溶解,以提供所需的 pH。在 pH 计的帮助下,通过滴定强酸或强碱,可以精确地调节溶液的 pH。

小　结

1. 水对一切生命有机体都是必需的。
2. 水分子能够与其他分子形成氢键，因为它有两个氢原子可作为供体，两对未成键电子对可作为受体。
3. 液态水是水分子形成的一种不规则的网络结构，其中每个水分子与其附近的水分子形成四个氢键。
4. 亲水性物质，如离子和极性分子，易溶于水。
5. 疏水效应是水与非极性物质的接触减至最小的趋势。
6. 水分子通过渗透从高浓度区域向低浓度区域运动；溶质通过扩散从高浓度区域向低浓度区域运动。
7. 水解离为 H^+（代表水合氢离子 H_3O^+）和 OH^-。
8. 溶液的 H^+ 浓度用 pH 值表示；酸性溶液的 pH<7，碱性溶液的 pH>7，中性溶液的 pH=7。
9. 酸能够提供质子，碱能够接受质子。酸的强度用 pK 表示。
10. Henderson-Hasselbalch 方程式把溶液的 pH 和酸及其共轭碱的浓度联系起来。
11. 缓冲液在缓冲物质 pK 的 1 个 pH 单位范围内可以抵抗 pH 的变化。

参考文献

Cooke, R. and Kuntz, I.D., The properties of water in biological systems, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **3**, 95–126 (1974).

Franks, F., *Water*, The Royal Society of Chemistry (1993).

Good, N.E., Winget, G.D., Winter, W., Connolly, T.N., Izawa, S., and Singh, R.M.M., Hydrogen ion buffers for biological research, *Biochemistry* **5**, 467–477 (1966).

Jeffrey, G.A, and Saenger, W., *Hydrogen Bonding in Biological Structures*, Chapters 1, 2, and 21, Springer-Verlag (1994). [Reviews hydrogen bond chemistry and its importance in small molecules and macromolecules.]

Segel, I.H., *Biochemical Calculations* (2nd ed.), Chapter 1, Wiley (1976). [An intermediate level discussion of acid–base equilibria with worked-out problems.]

Stillinger, F.H., Water revisited, *Science* **209**, 451–457 (1980). [An excellent outline of water structure on an elementary level.]

Tanford, C., *The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes* (2nd ed.), Chapters 5 and 6, Wiley-Interscience (1980). [Discusses the structures of water and micelles.]

关　键　词

极性的　polar
氢键　hydrogen bond
范德华距离　van der Waals distance
范德华力　van der Waals force
London 分散力　London dispersion forces
亲水的　hydrophilic
疏水的　hydrophobic
溶剂化　solvation
水合　hydration
疏水效应　hydrophobic effect
两亲性　amphiphilic 或 amphipathic
分子束　micelle
双分子层　bilayer
水合作用的水　water of hydration
依数性　colligative properties
渗透　osmosis
渗透压　osmotic pressure
扩散　diffusion
透析　dialysis
水合氢离子　hydronium ion
质子跳跃　proton jumping
解离常数　dissociation constant
K_w
中性溶液　neutral solution
酸性溶液　acidic solution
碱性溶液　basic solution
pH
酸　acid
碱　base
共轭碱　conjugate base
共轭酸　conjugate acid
pK

弱酸 weak acid

弱碱 strong acid

Henderson-Hasselbalch 方程 Henderson-Hasselbalch equation

滴定曲线 titration curve

缓冲液 buffer

多质子酸 polyprotic acid

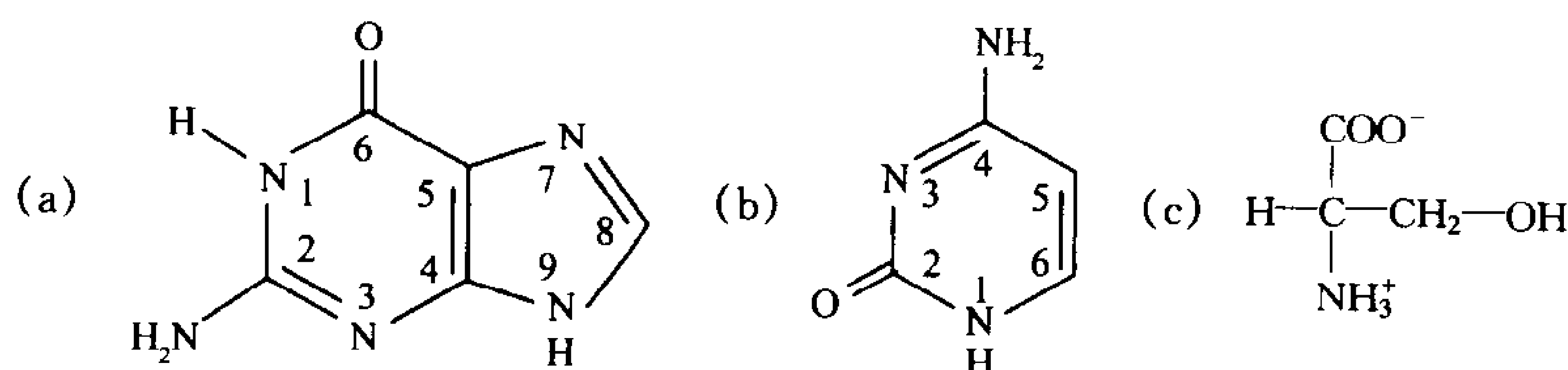
缓冲能力 buffering capacity

学习思考题

1. 比较冰和液态水中的氢键。
2. 解释为什么极性物质溶于水,而非极性物质则不溶于水。
3. 叙述熵对疏水效应的作用。
4. 为什么两亲分子在水中形成分子束?
5. 渗透与扩散有何不同?
6. 比较 Arrhenius 和 Brϕnsted-Lowry 对酸和碱的定义。
7. 解释为什么 $1mol \cdot L^{-1}$的 HCl 溶液的 pH 为 0。

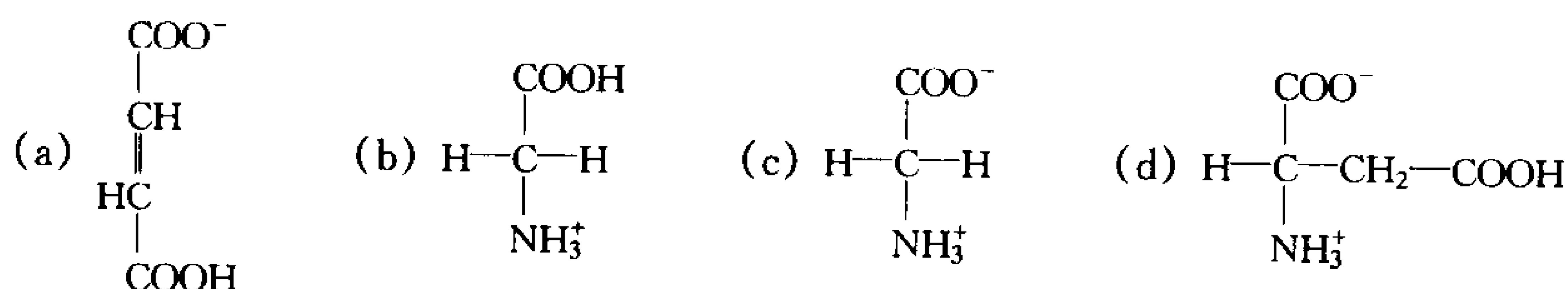
练 习 题

1. 识别下列分子中潜在的氢键供体和受体:



2. 在含有软脂酸分子束的水中,下列物质将分配在何处?

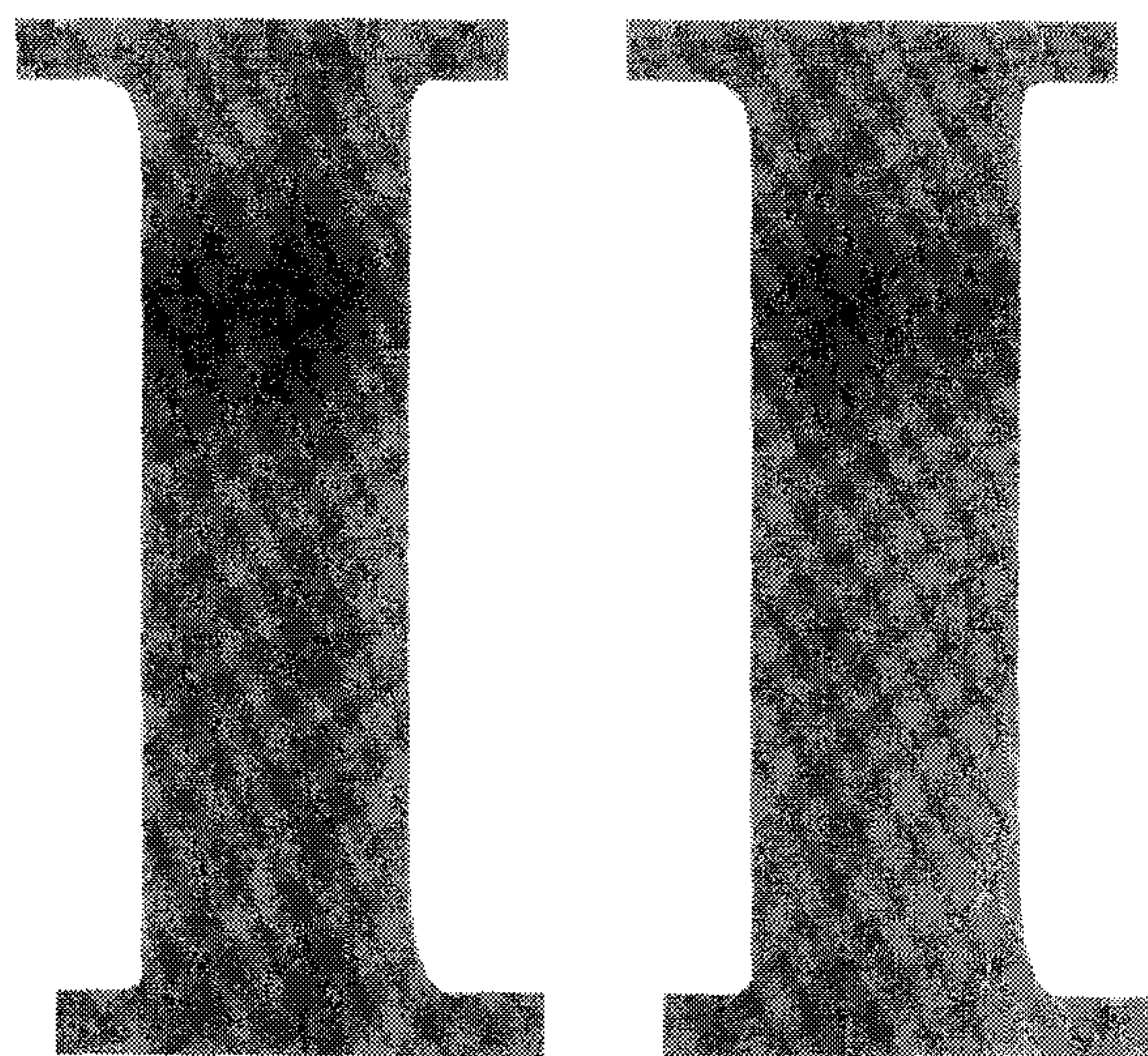
   (a)$^{+}H_3N—CH_2—COO^-$,(b)$^{+}H_3N—(CH_2)_{11}—COO^-$,(c)$H_3C—(CH_2)_{11}—COO^-$
3. 当一个装有纯水的透析袋悬浮于盛有海水的烧杯中时,描述会发生什么。如果透析膜允许水而不允许溶质通过,将会发生什么?
4. 比较细菌(长 3μm,直径 0.5μm)和鱼(长 30cm,直径 5cm)的表面积与体积之比,假定这两种生物是圆柱体形。
5. 画出下列酸的共轭碱的结构:



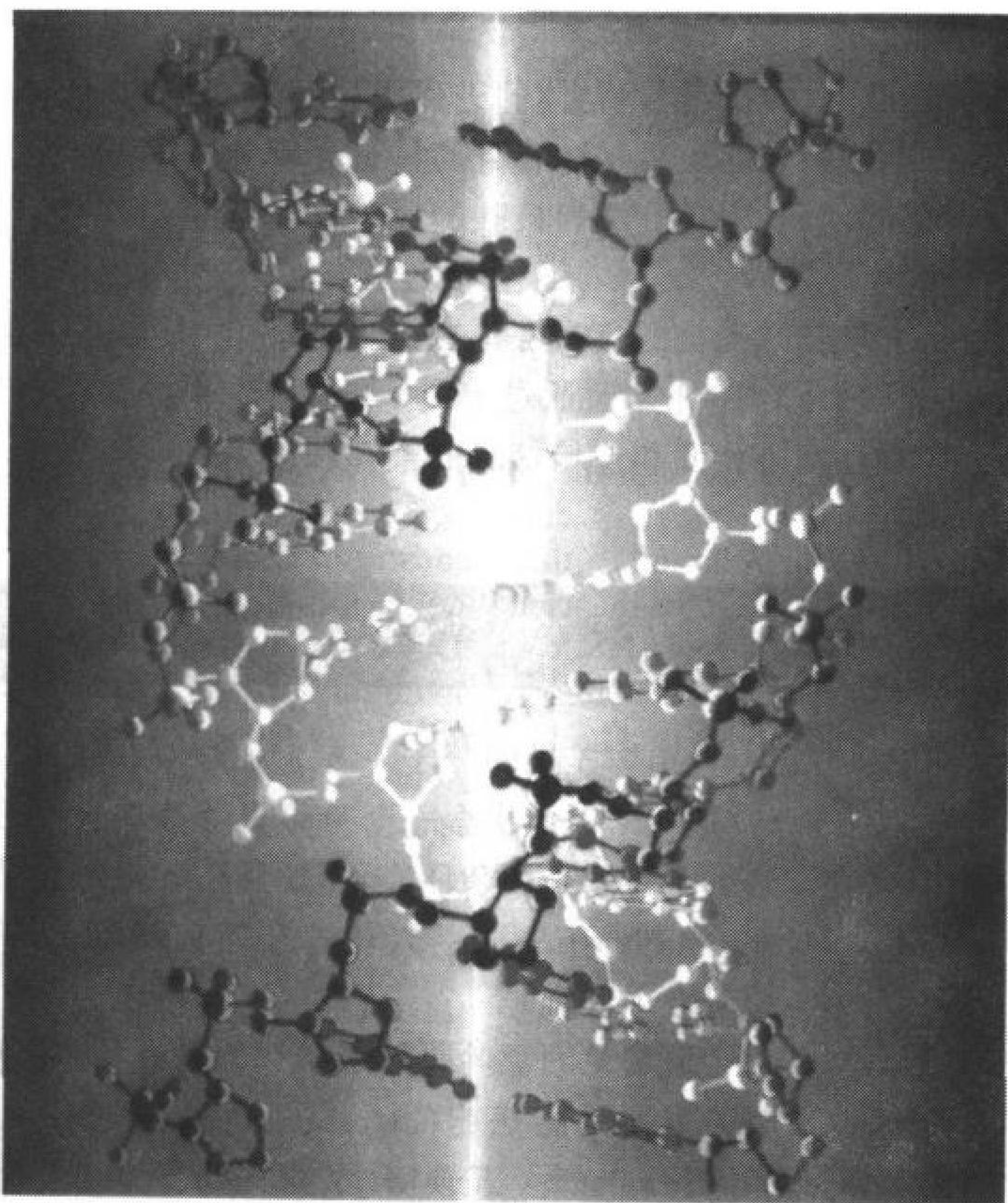
6. 指出(a)氨和(b)磷酸在 pH 4、8 和 11 时占优势的离子种类。
7. 计算含(a)10ml $5mol \cdot L^{-1}$ NaOH,(b)10ml $100mmol \cdot L^{-1}$甘氨酸和 20ml $5mol \cdot L^{-1}$ HCl,以及(c)10ml $2mol \cdot L^{-1}$醋酸和 5g 醋酸钠(摩尔质量为 82g)的 1L 溶液的 pH。
8. 在 1L 水中需加入多少克的琥珀酸钠(摩尔质量 140g)和琥珀酸二钠(摩尔质量 162g)才能产生 pH 为 6.0,且溶质总浓度为 $50mmol \cdot L^{-1}$的溶液?
9. 在 100ml $100mmol \cdot L^{-1}$的磷酸溶液中需加入多少体积的 $5mol \cdot L^{-1}$ NaOH 才能将 pH 从 4 调节到 9。
10. (a)在 pH=5 时,磷酸或琥珀酸何者是较好的缓冲液?(b)在 pH=9 时氨或六氢吡啶何者是较好的缓冲液?(c)在 pH=7.5 时,HEPES 或 Tris 何者是较好的缓冲液?

(南京大学 陈兰明 译)

第二篇　生 物 分 子



第3章　核苷酸和核酸



一个DNA分子是由围绕着一个中心轴(图中所示发光的线)的两条链组成的。一套完整的基因结构只含有4种类型的单体。这些单体连接成的序列构成了一种生物信息的模式，并能被有效地解码和精确地拷贝。(引自 Irving Geis)

---

1. 核苷酸的结构和功能
2. 核酸的结构
   A. DNA的碱基组成
   B. 双螺旋结构
   C. 单链核酸
3. 核酸功能的概述
   A. DNA携带遗传信息
   B. 基因指导蛋白质合成
   C. RNA世界
4. 核酸测序
   A. 限制性内切核酸酶
   B. 电泳和限制酶酶切图谱
   C. 链终止测序法
   D. 测序、突变和进化
5. DNA重组技术
   A. 克隆技术
   B. 基因文库
   C. 用聚合酶链反应进行DNA扩增
   D. DNA重组技术的应用

42

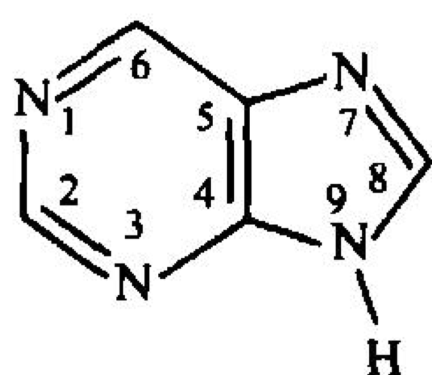
如果根据活细胞主要分子组分的物理和化学性质进行分类，那么**核苷酸**(nucleotide)比起其他分子的用途更多一些。与其他种类分子如氨基酸、糖和脂肪分子相比，核苷酸更值得注意，因为与它们相关的反应对于生命的维持和繁殖是十分关键的。特别是，核苷酸参与能量传递，并且它们的聚合体——**核酸**(nucleic acid)，在遗传信息的贮存和解码过程中是主要的参与者。在细胞中，核苷酸和核酸也能执行构建和催化作用。没有任何其他分子能承担如此多的功能，或者说是如此多生命的基本功能。

进化论者认为是核苷酸的出现使得生物体的进化成为可能，它使生物体能从周围的环境中捕获和贮存能量，并且更重要的是能使生物体自身拷贝。尽管关于早期生命形式的化学和生物的详细情况还是正在探索的课题，但核苷酸和核酸的化学性质与我们所了解的生命具有密不可分的联系，这是不容置疑的。

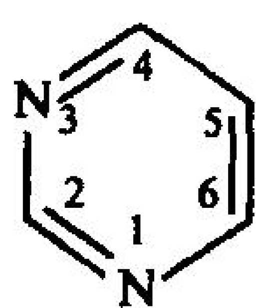
在这一章里，我们研究核苷酸和核酸(RNA 和 DNA)的结构。我们还讨论 DNA 分子中一段核苷酸序列所包含的信息，以及在体外如何通过 DNA 重组技术来操作这些信息。在后面的章节中，我们将更详细地研究在新陈代谢和遗传信息的贮存和表达过程中核苷酸和核酸的参与过程。

1. 核苷酸的结构和功能

核苷酸是普遍存在并具有相当大结构差异的分子。有 8 种基本核苷酸，每种都有一个含氮的碱基，它与至少含一个磷酸基的糖分子相连接。核苷酸的碱基是平面的芳香族杂环分子，并且在结构上是**嘌呤**(purine)或**嘧啶**(pyrimidine)的衍生物(尽管它们在体内不是由这些有机物中的任何一个合成)。



嘌呤



嘧啶

最常见的嘌呤是**腺嘌呤**(adenine, A)和**鸟嘌呤**(guanine, G)，嘧啶主要是**胞嘧啶**(cytosine, C)、**尿嘧啶**(uracil, U)和**胸腺嘧啶**(thymine, T)。嘌呤通过它们的 N9 原子与一个五碳糖(戊糖)形成化学键，而嘧啶则通过 N1 原子与戊糖结合(表 3-1)。

在**核糖核苷酸**(ribonucleotide)中(图 3-1a)，戊糖是**核糖**(ribose)，而在**脱氧核糖核苷酸**(deoxyribonucleotide)中(图 3-1b)，糖分子是 **2′-脱氧核糖**(2′-deoxyribose)(也就是 C2′上缺少一个羟基)。注意带“′”的数字指的是核糖的原子，而未带“′”的指的是碱基的原子。磷酸基团结合到戊糖的 C3′或 C5′，分别形成 3′-核苷酸或 5′-核苷酸。当没有磷酸基团时，此化合物被称为**核苷**(nucleoside)。因此 5′-核苷酸也被称为 5′-磷酸核苷。

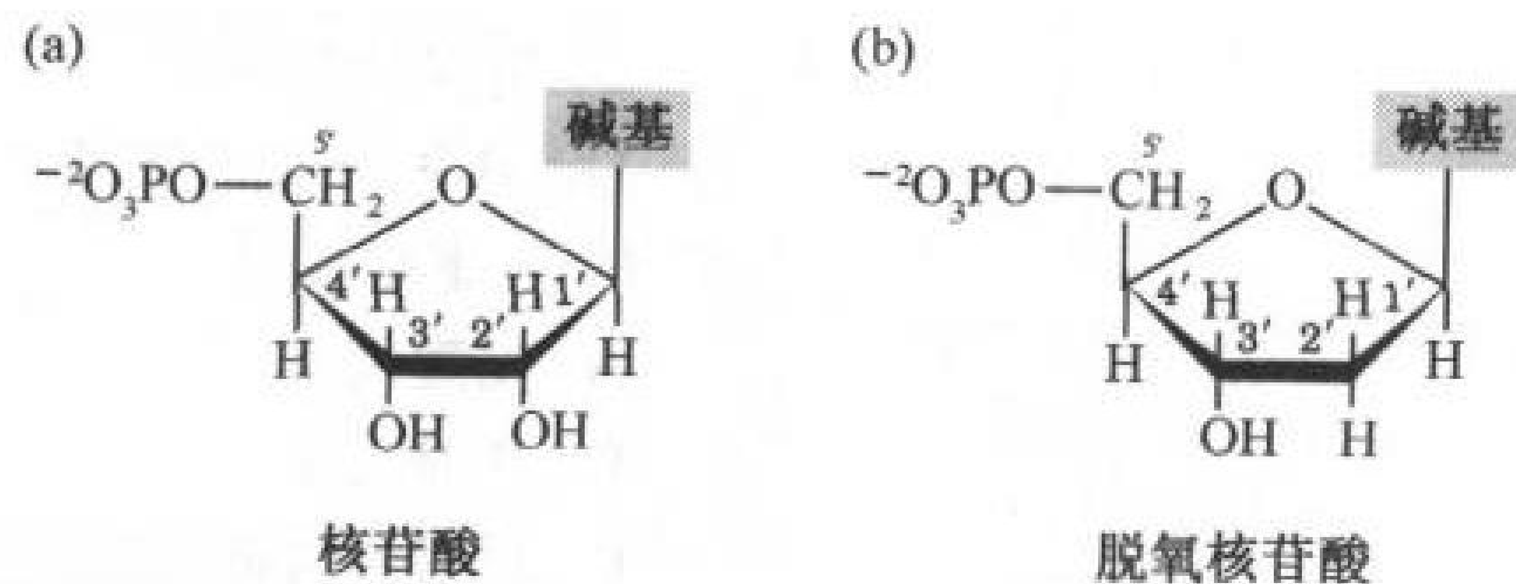


图 3-1 (a)核苷酸和(b)脱氧核苷酸的化学结构式

嘌呤或嘧啶碱基与戊糖的 C1′相连并且戊糖至少连接一个磷酸。

表 3-1 中给出了常见碱基、核苷和核苷酸的结构、名称和缩写。**RNA(核糖核酸)**中为核苷酸,而 **DNA(脱氧核糖核酸)**中为脱氧核苷酸。腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶存在于核苷酸和脱氧核苷酸(占了 8 种基本核苷酸中的 6 个),但是尿嘧啶主要存在于核苷酸中,胸腺嘧啶则存在于脱氧核苷酸。游离的核苷酸带有负电,在细胞中通常和带相反电荷的 Mg^{2+} 相连。

44

表 3-1 核酸碱基、核苷和核苷酸的名称和缩写

碱基结构式	碱基 (X=H)	核苷 (X=核糖[a])	核苷酸[b] (X=磷酸核糖[a])
(腺嘌呤结构式:NH_2, N, X)	腺嘌呤 Ade A	腺苷 Ado A	腺苷酸 单磷酸腺苷 AMP
(鸟嘌呤结构式:O, H, N, H_2N, X)	鸟嘌呤 Gua G	鸟苷 Guo G	鸟苷酸 单磷酸鸟苷 GMP
(胞嘧啶结构式:NH_2, N, O, X)	胞嘧啶 Cyt C	胞苷 Cyd C	胞苷酸 单磷酸胞苷 CMP
(尿嘧啶结构式:O, H, N, X)	尿嘧啶 Ura U	尿苷 Urd U	尿苷酸 单磷酸尿苷 UMP
(胸腺嘧啶结构式:O, H, CH_3, N, dX)	胸腺嘧啶 Thy T	脱氧胸苷 dThd dT	脱氧胸苷酸 单磷酸脱氧胸苷 dTMP

[a] 通过前缀"deoxy"或"d"来表示 DNA 中的核糖是 2′-脱氧核糖。例如,腺嘌呤脱氧核苷写成"deoxyadenosine"或者"dA"。然而,对于在 RNA 中很少见的胸腺嘧啶残基,加前缀是多余的,可以略掉。核糖也可通过前缀"ribo"或"r"来明确指出。这样,胸腺嘧啶核糖核苷酸也就写成"ribothymidine"或者"rT"。

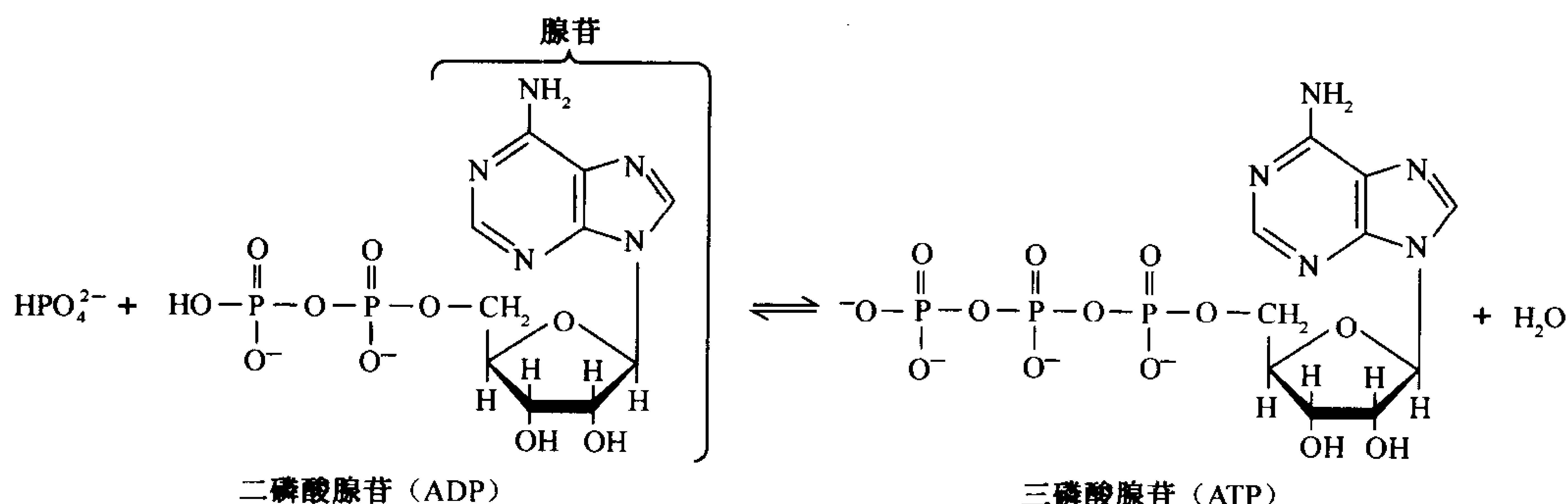
[b] 在核苷酸中磷酸基团的位置可以明确地指定,例如,3′-AMP 和 5′-GMP。

核苷酸和核苷酸衍生物的功能

在任何细胞中,大量的核苷酸是以聚合体的形式存在,或是 RNA,或是 DNA,它们的基本功能是信息的贮存和传递。然而游离的核苷酸和核苷酸衍生物执行着大量而多样的代谢功能,与遗传信息的操纵无关。

或许最广为人知的核苷酸就是**三磷酸腺苷**(adenosine triphosphate, ATP),这个核苷酸包含

一个腺嘌呤、一个核糖和一个三磷酸基团。ATP 常常被错误地认为是一个贮存能量的分子，但是它更准确的定义应该是能量的载体或传送者。光合作用或者代谢养料（例如糖和脂肪酸）的消耗均可使**二磷酸腺苷**（adenosine diphosphate, ADP）形成 ATP：



ATP 扩散到细胞中为其他的细胞工作提供能量，例如生物合成反应、离子转运和细胞的移动。当 ATP 转移它的一个或两个磷酸基团给其他分子时，它的能量才成为有效的能量。这个过程能通过上述反应的逆过程来表示，即 ATP 水解生成 ADP。（我们在以后的章节中将看到，在细胞中 ATP 和 ADP 的相互转变并不是自由地可逆进行，并且游离的磷酸基团很少直接从 ATP 中释放出来。）经过计算参与细胞日常活动的 ATP 的量表明，当 ATP 在细胞中的浓度适量时（约 $5mmol\cdot L^{-1}$），每天一个普通人会转换相当于他（她）自身重量的 ATP。

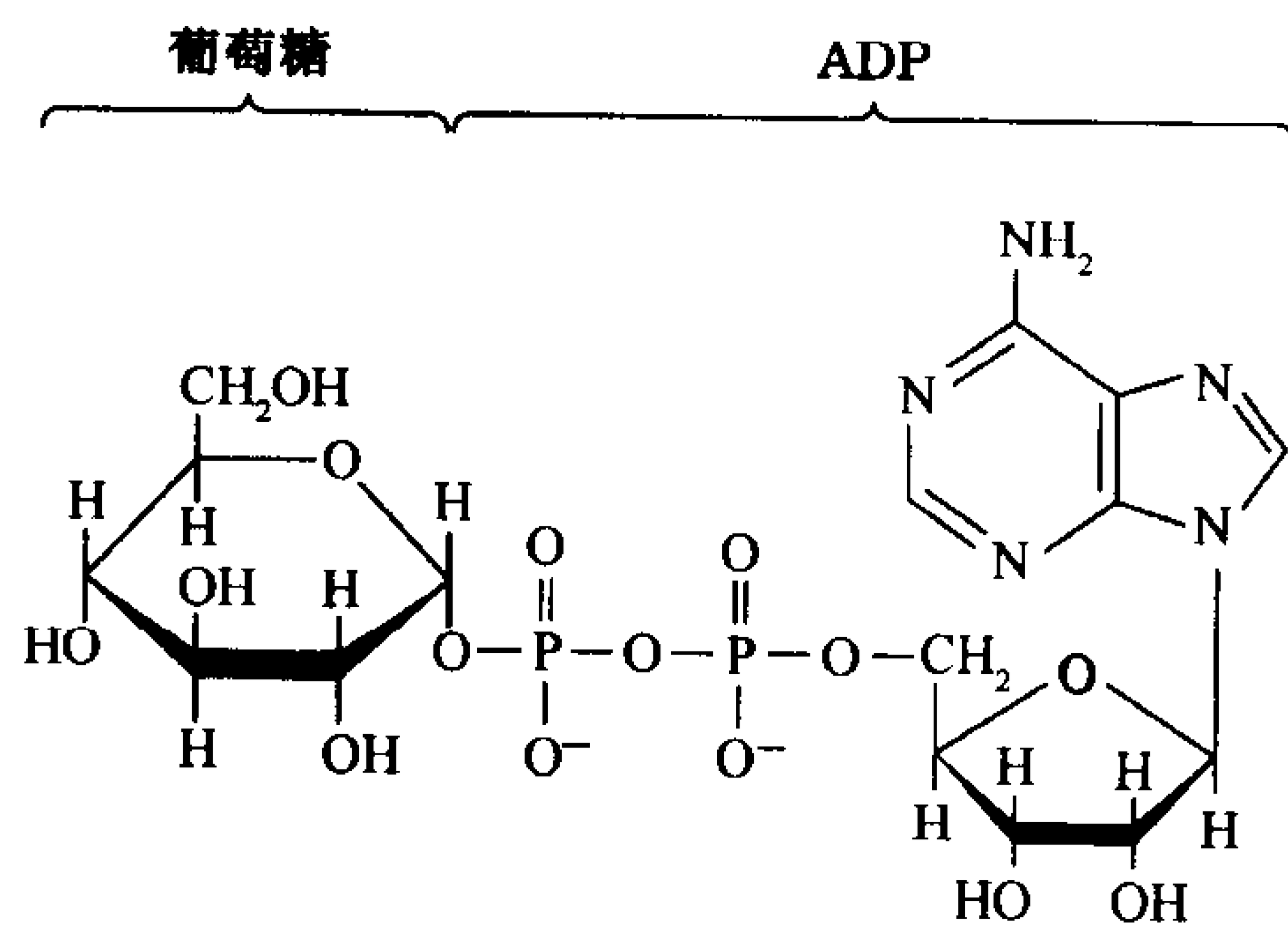


图 3-2 ADP-葡萄糖

在这个核苷酸衍生物中，葡萄糖和腺苷通过两个磷酸基团相连在一起。

在许多新陈代谢反应中，核苷酸并不是转移一个磷酸基团，而是另一种组分取代磷酸基的位置。例如：植物体内淀粉的合成就是通过 ADP-葡萄糖降解出葡萄糖单元，再重复加合成淀粉的过程（图 3-2）。通过核苷酸衍生物来提供另外基团的例子，在其他复合糖类（节 15-2 和节 15-5）和膜脂（节 19-6）的合成途径中也可以发现。

所有已知的生物体都利用 ATP 作为能量载体，这表明 ATP 的地位在进化早期就已被确定。对于在古生物新陈代谢过程中核苷酸具有支配地位的其他证据，可以在现代生物的新陈代谢途径中找到。*所有获得能量的基本过程——无论是来自太阳、无机物（矿物质），或是有机物——都依赖一系列核苷酸衍生物以不连续的能量形式进行传递。*尽管在不同生物体中能量代谢有巨大的差异，但有几种核苷酸衍生物显示出是无所不在的，它们是黄素腺嘌呤二核苷酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸和辅酶 A。

45

黄素腺嘌呤二核苷酸（flarin adenine dinucleotide, FAD）含有腺苷并通过两个磷酸基团与**核黄素**（riboflavin）相连接（图 3-3）。FAD 的核黄素部分可以被许多种生物合成，但人类不能自身合成，人类必须从饮食中获得核黄素（也称**维生素 B_2**）。FAD 中核黄素部分的杂环系统能被可逆地还原（节 13-3A）。由于这个原因，在许多生物体的氧化还原反应中都有 FAD 参与。

烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+），与 FAD 一样参与氧化还

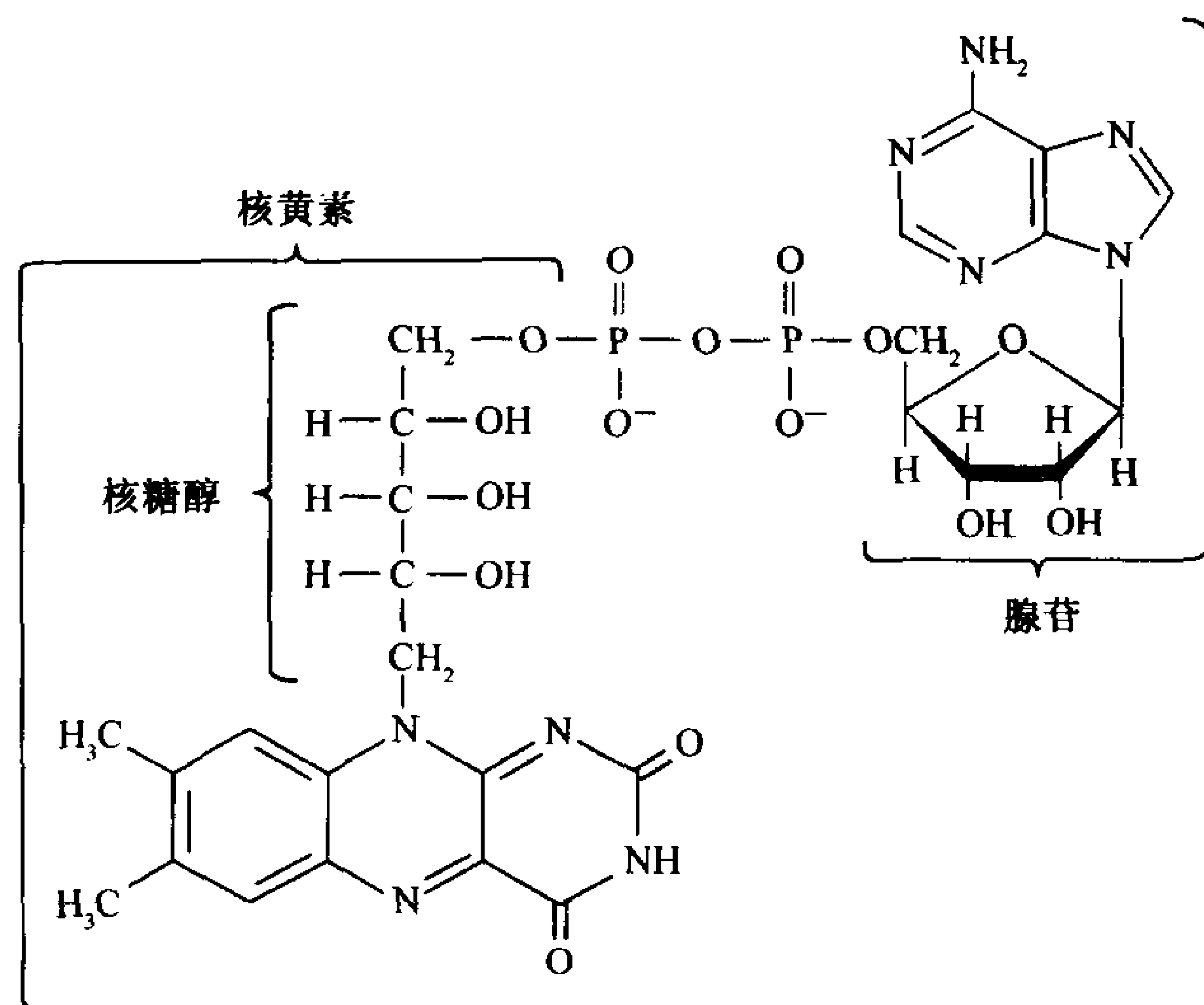
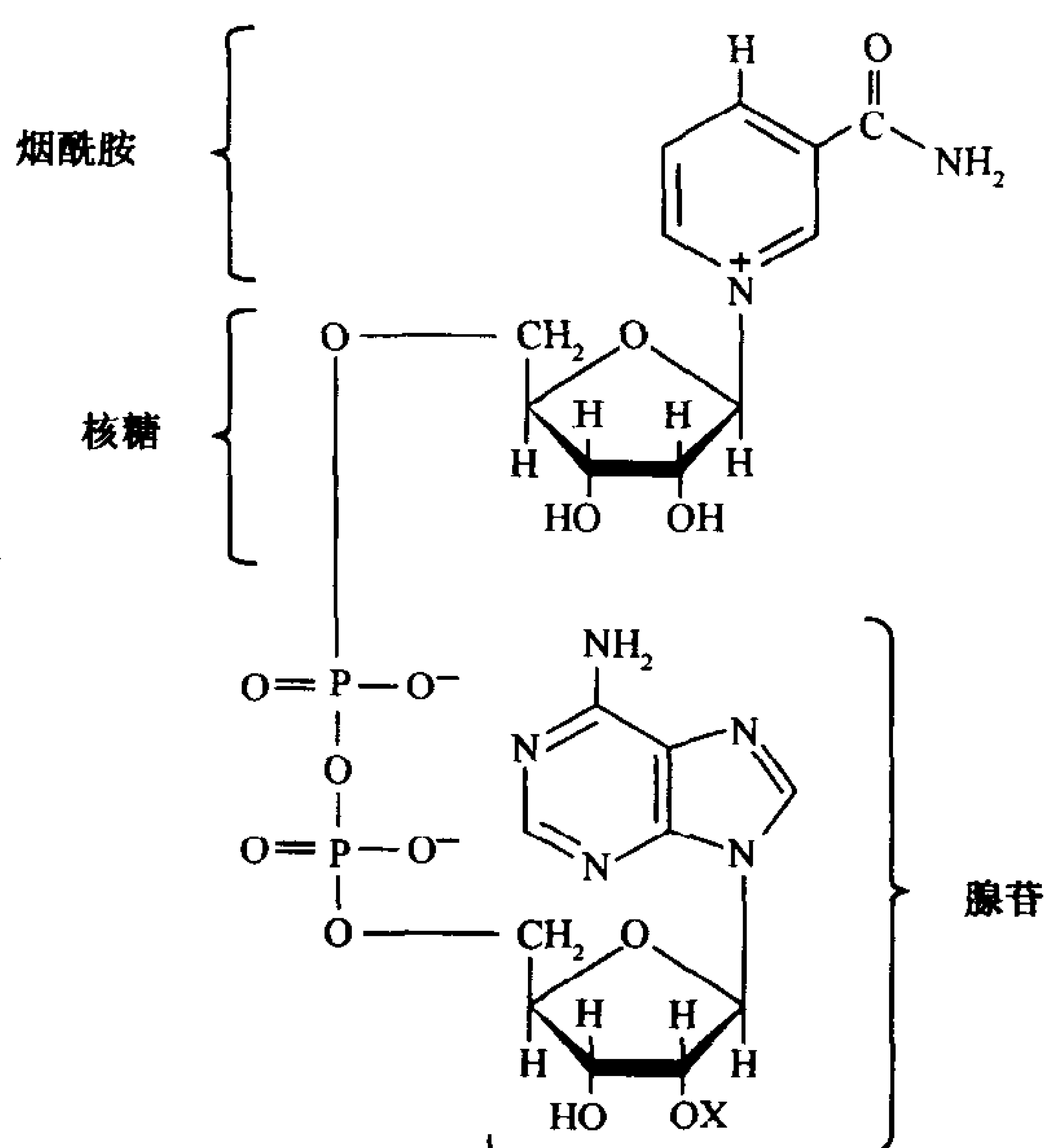


图 3-3 核黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)

腺苷通过两个磷酸与核黄素相连接。

原反应(节 13-3A)。在 NAD^+ 和相关化合物**烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸**(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, $NADP^+$)中,腺苷通过两个磷酸与核糖和**烟酰胺**(nicotinamide)相连接(图 3-4)。在 $NADP^+$ 中,第三个磷酸基团连在腺苷核糖的 2′位置上。NAD^+ 和 $NADP^+$ 的烟酰胺部

46



X = H 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)

X = PO_3^{2-} 烟酰胺腺嘌呤二核苷磷酸($NADP^+$)

图 3-4 烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸($NADP^+$)

这些二核苷酸含有连接一个烟酰胺核苷酸的腺苷。$NADP^+$ 包含的另外的一个磷酸在它的腺苷残基的 C2′上。

分，它们都是由维生素**烟酸**(niacin)衍生而来(节 11-1C)，是发生可逆还原反应的位点。值得注意的是在这个二核苷酸里，NAD^+的烟酰胺碱基是和一个磷酸化的核糖相连接，从而形成了两种核苷酸的一种。

47

辅酶 A(CoA)(图 3-5)，是另一个核苷酸衍生物，尽管它不能进行氧化或还原作用，但它在新陈代谢过程中还是扮演着一个重要角色。CoA 是酰基[$CH_3(CH_2)_n$ CO —]的一个载体，是非电子载体。酰基(通常是乙酰基，CH_3CO—)与分子中半胱氨酸末端的巯基相连。辅酶 A 来源于**泛酸**(pantothenic acid，也称**维生素 B_3**)。

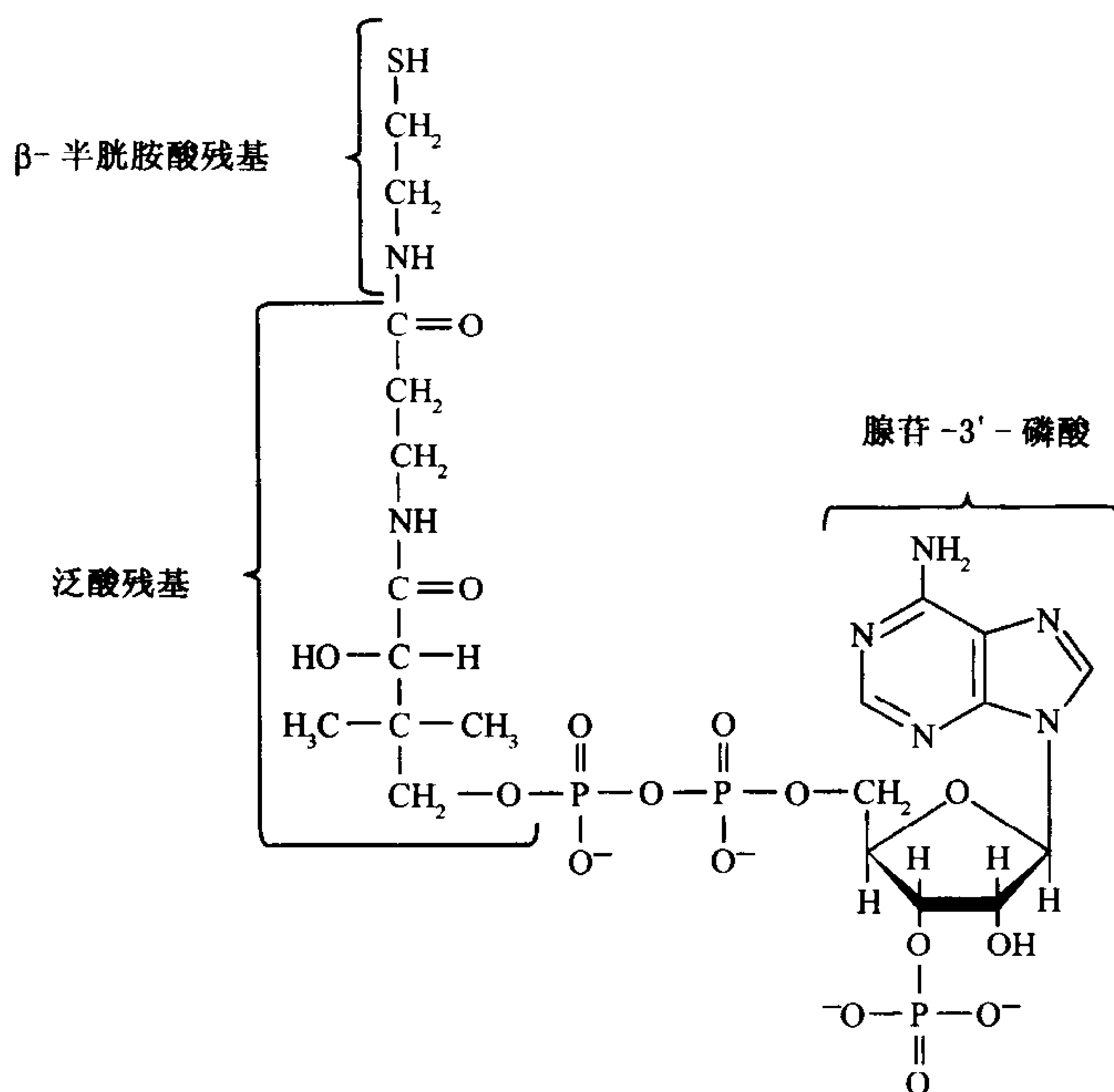


图 3-5　辅酶 A(CoA)

这个腺苷衍生物带有一个酰基，这个酰基以硫酯键与巯基共价相连。

在前生物进化过程中，FAD、NAD^+和 CoA 这些化合物的基本性质，很难想象出其他何种化学物质会超过它们。一旦核苷酸进化产生，它们就逐渐担当起各种角色。即使在它们的基础上发展起来其他的一些结构物质和进程，在新陈代谢领域中它们仍然起着关键的作用。

2. 核酸的结构

核苷酸能够彼此相互连接形成聚合体，即我们熟悉的 RNA 和 DNA。核酸是由许多条核苷酸链组成，每条链都以磷酸基为桥(磷酯键)从一个核苷酸的 3′连到相邻核糖的 5′位置上(图 3-6)。这些**多核苷酸**(polynucleotide)的磷酸基是酸性的，所以在生理 pH 下，核酸是多聚阴离子化合物。

48

单核苷酸之间的连接被称为**磷酸二酯键**(phosphodiester bond)，如此命名是因为磷酸与两个核糖单位发生了酯化。多聚核苷酸中的每一个核苷酸又被称作核苷酸残基。C5′没有和其他核

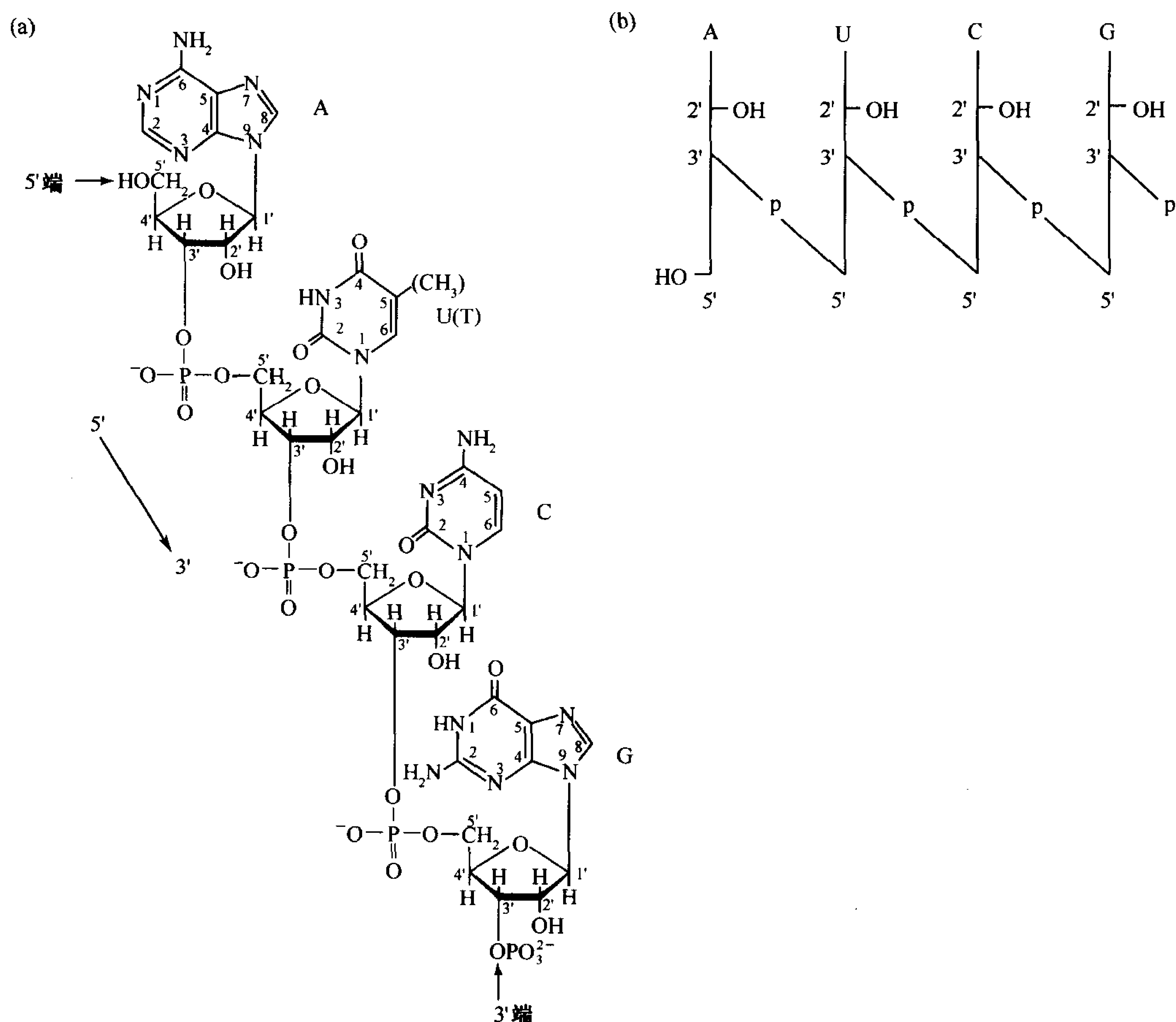


图 3-6　结构的秘诀：核酸的化学结构

(a) 四聚核苷酸，腺酰基-3′，5′-尿酰基-3′，5′-胞酰基-3′，5′-鸟酰基-3′磷酸。糖基的原子以“′”区别于碱基的原子，通常，多聚核苷酸的序列 5′端写在左边，3′端写在右边。这样从左向右读，磷酸二酯键的 5′到 3′的方向连接相邻的两个核糖残基。图中所示序列可简写为 ApUpCpGp 或 AUCGp(对于核苷符号右边的“P”指的是 3′磷酸基团)。相应地，脱氧四聚核苷酸中所有核糖 2′-OH 均被 H 所替代，并且尿嘧啶(U)被胸腺嘧啶(T)代替，它被简写成 d(ApTpCpGp)或 d(ATCGp)。(b) AUCGp 示意图。纵线表示核糖残基，连接的碱基用简单的字母表示，斜线旁边的任何一个“P”表示一个磷酸二酯键。核糖基上的原子被省略。相应的 d(ATCGp)的区别仅仅在于核糖 2′-OH 的缺失和用 T 代替 U 来表现。

苷酸相连接的末端残基被称为 **5′端**，而 C3′没有和其他残基相连的末端残基被称为 **3′端**。

像核酸这样的聚合物可能和未聚合前它的单个残基或**单体**(monomer)，在性质上完全不同。当聚合物的大小从**二聚体**(dimer)、**三聚体**(trimer)、**四聚体**(tetramer)等等开始增大，并经历**寡聚体**(oligomer)阶段后，物理性质如带电量和溶解度也发生了变化。除此以外，*不同残基组成的多聚物具有组成它的单体所没有的性质，也就是它包含由它的全部残基序列所形成的信息。*

A. DNA 的碱基组成

尽管典型 RNA 分子的核苷酸组成没有规律性，但 DNA 中有相等数量的腺嘌呤和胸腺嘧啶

(A = T)以及相等数量的鸟嘌呤和胞嘧啶(G = C)。这种关系被称为 **Chargaff 法则**,是由 Erwin Chargaff 于 20 世纪 40 年代末发现的。他设计出了第一个 DNA 组分分析的可靠定量方法。

在不同生物体中 DNA 碱基组成变化很大。在不同种的细菌中,G + C 的范围值在 25% ~ 75%之间。然而,亲缘物种间含量差不多;例如,在哺乳动物中 G + C 的范围值在 39% ~ 46%之间。Chargaff 法则的重要性当时并没有很快被理解,但我们现在知道这个法则的结构本质来源于 DNA 双螺旋的性质。

B. 双螺旋结构

1953 年,James Watson 和 Francis Crick 确定了 DNA 的结构,这是现代分子生物学诞生的标志。DNA 的 **Watson-Crick 结构**模型不仅解决了生命中有争议的中心分子模型,它也指出了遗传的分子机制。Watson 和 Crick 的成就是科学上的重大成就之一,除了基于 Chargaff 法则外,它还有两个证据:正确的碱基互变异构形式和 DNA 是一个螺旋分子的许多特征。

核酸的嘌呤和嘧啶碱基能表现不同的互变异构形式(互变异构体仅是氢位置上的变动,这就很容易地转变为它的**异构体**;图 3-7)。X 射线、磁共振(NMR)和光谱研究已经完全证实在互变异构体内,核酸碱基以酮基存在的形式占有绝对多数(图 3-6)。然而在 1953 年,这并非被广泛所知。Jerry Donohue 提出了互变异构体中占主要地位的分子形式,他是 Watson 和 Crick 的同事,同时也是一位有机小分子 X 射线衍射结构的专家。

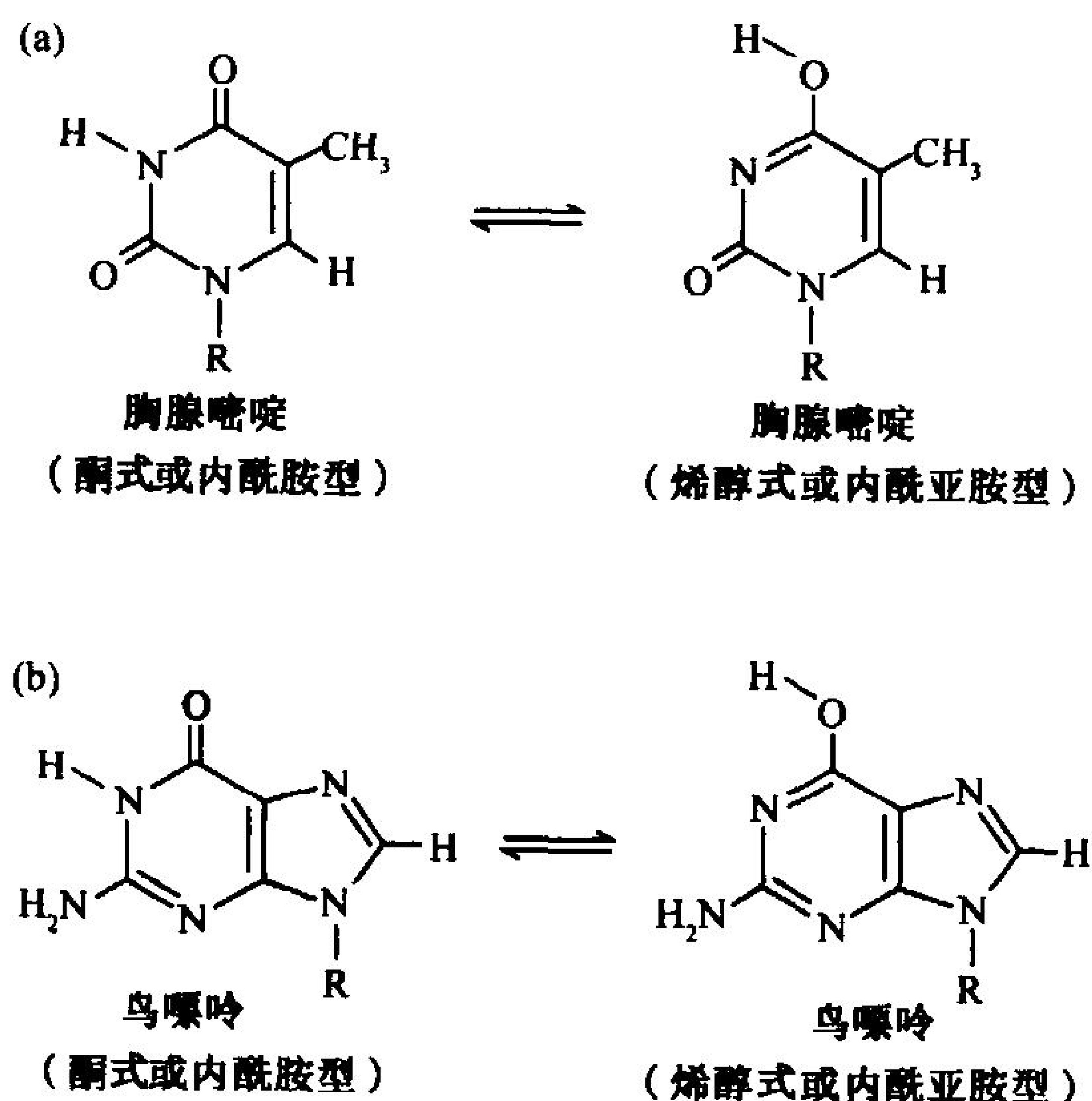


图 3-7 碱基互变异构体

(a)胸腺嘧啶。(b)鸟嘌呤的一些可能的互变异构形式。胞嘧啶和腺嘌呤也能进行相似的质子转移。

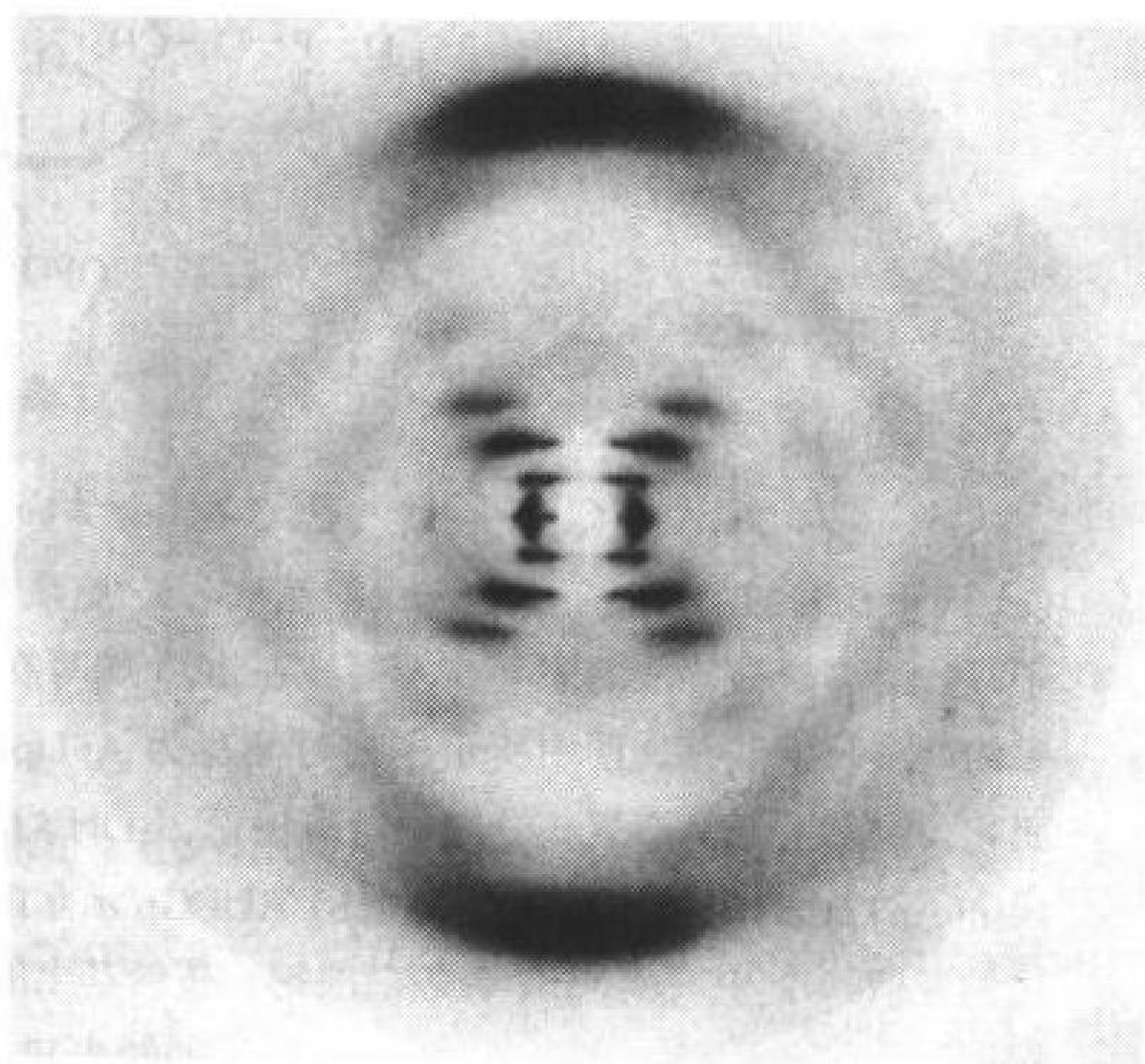


图 3-8 垂直方向的 DNA 结构的 X 射线衍射照片

由 Rosalind Franklin 拍摄的这张照片为 Watson-Crick 结构的假说提供了关键的证据。X 形的中心表示一个螺旋,而衍射图谱中的上面和下面的两条深黑色弧表示螺旋的重复部分(3.4Å)。(引自 Maurice Wilkins, King's College, London)

Rosalind Franklin 应用 X 射线衍射拍摄的 DNA 骨架照片进一步证明了 DNA 是一个螺旋分子(图 3-8)。通过 X 射线对晶体扫描的照片使 Crick 推断(a)DNA 是一个螺旋分子,(b)它的平面芳香碱基形成堆积并且平行于纤维中心轴。

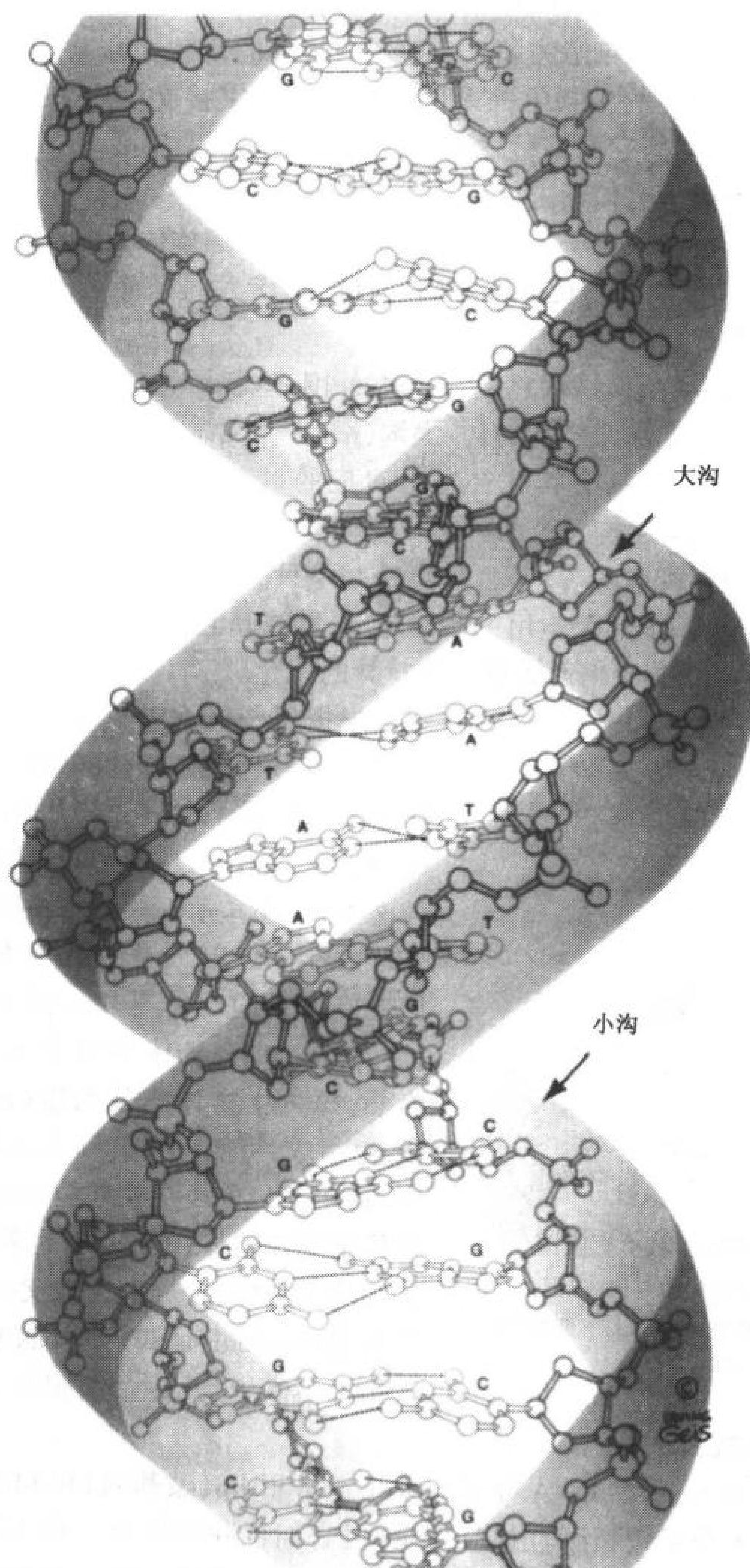


图 3-9 DNA的三维结构

重复螺旋是基于由 Richard Dickerson 和 Horace Drew 所确定的自身互补的十二聚体 d(CGCGAATTCGCG)。在这个球棍模型中，所看位置与螺旋轴线相垂直，磷酸－糖骨架(带有核糖外框)围绕在分子的外缘。核心中的碱基形成多对氢键。为了更清晰，图中氢原子被省略，两条链反向平行。(引自 Irving Geis)

49 有限的结构信息，连同 Chargaff 法则，只对 DNA 的结构提供了很少的线索；Watson 和 Crick 的模型设想来源于他们的创造力和正在建立的模型的研究。当 Watson 和 Crick 模型一被公布，它那简单的原理和明显的生物学关系使它很快被大家接受。后来的研究证实了 Watson-Crick 模型大体的正确性，尽管它的细微之处经过了修改。

50 Watson-Crick DNA 模型有如下主要特点：

1）两条多聚核苷酸链围绕着一根共同的轴形成一个**双螺旋**(double helix)(图 3-9)。

2）DNA 的两条链是**反向平行**(antiparallel)的(向相反方向延伸)，但每条都是右手螺旋(左手螺旋与右手螺旋的区别如图 3-10 所示)。

3）碱基位于螺旋的中心，而磷酸糖链围绕在外围，这样带电磷酸基团间的斥力降到最小。双螺旋的表面有两条深浅不同的沟：**大沟**(major groove)和**小沟**(minor groove)。

51 4）一条链上的每一个碱基与其互补链上对应的碱基依靠氢键形成平面的**碱基对**(base pair)。Watson-Crick 结构只有两种类型的碱基对。每个腺嘌呤必须与胸腺嘧啶配对，反之胸腺嘧啶也只能配腺嘌呤，并且鸟嘌呤必须只配胞嘧啶，同样胞嘧啶也只能配鸟嘌呤(图 3-11)。这些氢键相互作用的现象被称为**碱基互补配对**(complementary base pairing)，从而导致双螺旋中的两条链发生特异的结合。



图 3-10 左手螺旋和右手螺旋图

在每个图中，手卷曲方向是螺旋的方向，大拇指方向为螺旋上升方向，值得注意的是当螺旋上下倒过来时，手性不变。

根据反链有互补碱基序列，Watson-Crick 结构就能给出另一条多核苷酸链的任意一段碱基序列。这进一步解释了 Chargaff 法则。更重要的是：它指出*每一条 DNA 链都可作为***模板**(template)*来合成它的互补链，并且每条链都能编码遗传信息。*

52 大部分 DNA 分子是相当大的，这与它们作为细胞遗传信息的载体是相一致的。除了少数例外以外，越复杂的有机体中包含越多的 DNA(表 3-2)。当然，每种生物体的**基因组**(genome)，即它惟一的 DNA 组成，可能被定位到几条**染色体**(chromosome)上，每条都包含一个独立的 DNA 分子。注意许多有机体都是**二倍体**(diploid)；也就是说，它们包括两套相同的染色体组，分别来自父母双方。**单倍体** DNA 的含量(haploid)是二倍体 DNA 总量的一半。例如，人是二倍体生物，每个细胞有 46 条染色体，因此他们单倍体中的染色体数为 23 条。

因为 DNA 分子很大，所以 DNA 分子的大小通常用 **bp(碱基对)**和 **kb(千碱基对)**的数目来表示。尽管每个 DNA 分子较长而且相对稳定，但它们也并非完全一成不变。在以后的章节中我们将了解到 DNA 双螺旋在细胞里能形成缠绕或环状。此外，DNA 根据核苷酸序列可以有不同的螺旋构象。最终，在另外一些细胞组分存在下，DNA 两条链可以更紧密地结合，或两条链部分发生解旋。(在第 23 章中我们将详述 DNA 的结构。)

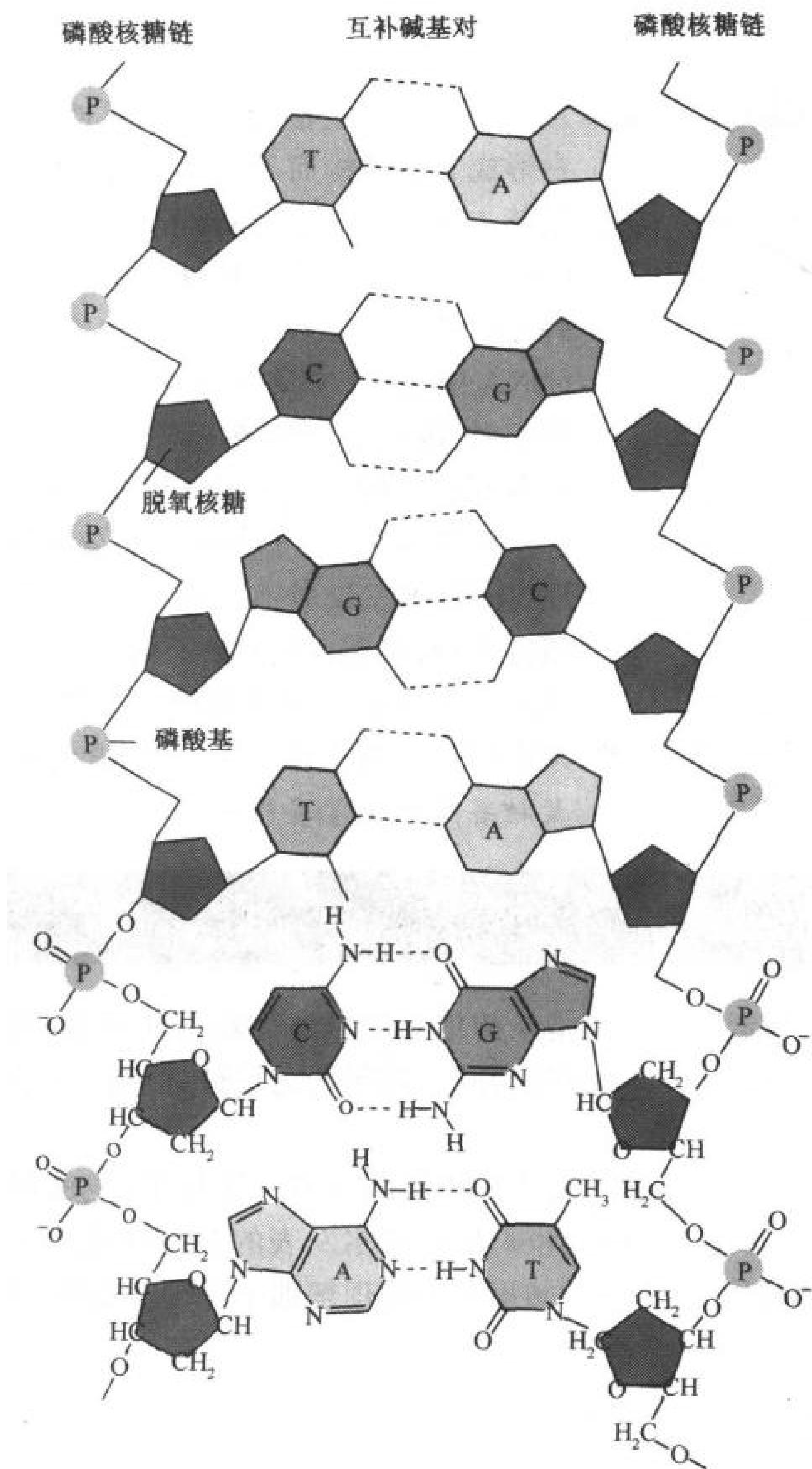


图 3-11　DNA 互补链

两条多核苷酸链通过碱基互补连接形成 DNA 双链。A 与 T、G 与 C 配对，以氢键相连。

表 3-2　部分 DNA 分子大小

生物体	碱基对的数目/kb[a]	生物体	碱基对的数目/kb[a]
病毒		细菌	
多瘤病毒 SV40	5.1	大肠杆菌	4600
λ 噬菌体	48.6	真核生物	
T2、T4、T6 噬菌体	166	酵母(16 对染色体)	12 600
禽痘病毒	280	果蝇(4 对染色体)	165 000
细菌		人(23 对染色体)	2 900 000
支原体	760		

[a] kb = 1000bp

来源：Kornberg, A. and Baker, T.A., DNA Replication(2nd ed), p.20, Freeman(1992)。

C. 单链核酸

单链 DNA 是很少见的，主要是作为某些病毒的遗传物质。相反地，RNA 则以单链为主，通常形成紧密结构而不是松弛结构(某些病毒的遗传物质是双链 RNA)。一条 RNA 链可以和它的互补链 RNA 或 DNA 互补配对，除了核糖具有 2′-OH 和要用尿嘧啶代替胸腺嘧啶之外，RNA 链与 DNA 链几乎相同。A 和 U 配对(DNA 中为 T)，G 和 C 配对。RNA 分子内经常会发生碱基配对，因此会产生**茎-环**(stem-and-loop)结构(图3-12)，或者环状结构相互作用而形成更复杂的结构。

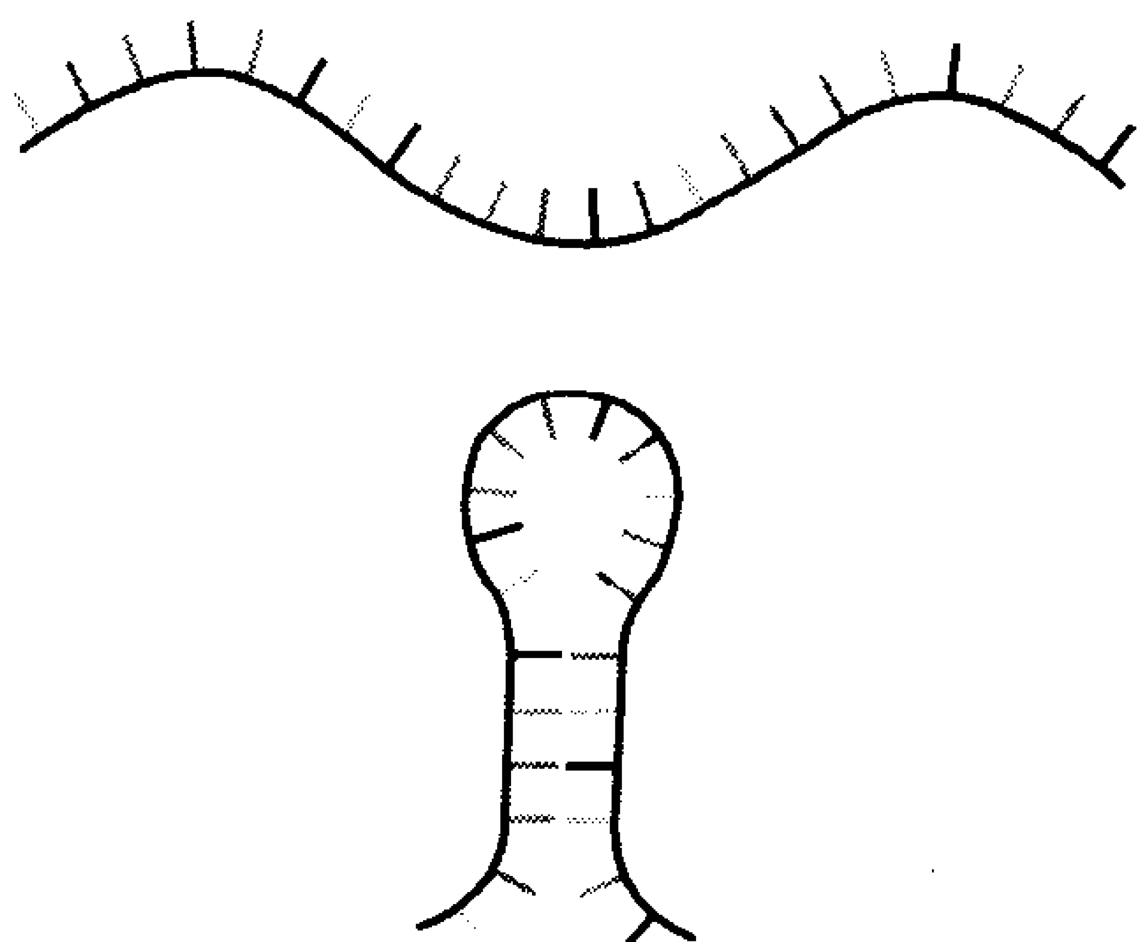


图 3-12 茎环结构的形成
一条 RNA 链内部互补序列之间碱基配对使得多聚核苷酸发生自我折叠。

53

单链 RNA 分子潜在的复杂结构提供了额外的证据表明，RNA 不仅仅具有贮存和传送遗传信息的功能。大量研究发现，某些 RNA 分子可以特异地结合有机小分子并且催化有这些分子参与的一些反应。这些发现对下面的理论提供了更重要的支持：*许多重要生命过程起始于小多聚核苷酸的化学多样性。*

3. 核酸功能的概述

在所有细胞和许多病毒中，DNA 是遗传信息的载体。然而从孟德尔发现遗传法则到 DNA 的生物学作用被阐明大约经历了 75 年的时间。甚至现在，遗传信息是如何被表达和传递给下一代的许多细节，目前仍不清楚。

孟德尔对大豆的研究使得他认为每个植物都包含有一对因子[也就是我们现在所说的**基因**(gene)]，分别来自它们的双亲。但是 1866 年孟德尔发表的遗传理论几乎完全被他同时代的人所忽略，因为用他们的解剖学和生理学知识并不能理解那个理论。最终，基因被假定为染色体的一部分，从此遗传学的研究速度大大加快了。

A .DNA 携带遗传信息

在 20 世纪 40 年代以前，普遍认为基因是由蛋白质构成的。因为那个年代，蛋白质是惟一被认为足够复杂能作为遗传载体的生化物质。在 1869 年，Friedrich Miescher 首次分离出核酸。但是当时认为核酸只有不变的核苷酸序列，并且认为它不可能作为遗传信息的载体。

在 Oswald Avery、Colin MacLeod 和 Maclyn McCarty 的共同努力下，DNA 被证明携带遗传信息。他们在 1944 年完成的实验表明，从肺炎双球菌的致病株中获得的 DNA(并不是蛋白质)可以使非致病株转化(transform)成致病株(图 3-13)。Avery 的发现最初被怀疑，但对 Erwin Chargaff 产生了影响，并且 Chargaff 法则(节 3-2A)导致了后来 DNA 的结构和功能模型的诞生。

54

DNA 的双螺旋链更易于它的**复制**(replication)。当一个细胞进行分裂时，每个 DNA 链可作为一个模板合成它的互补链(图 3-14)。之后，每一个子代细胞包含有一个完整 DNA 分子(或者是生物体的一套 DNA 分子)。每个 DNA 分子包括一条亲链和一条子链，子链以亲链为模板通过核苷酸的逐步配对聚合而成。复制的机制我们将在第 24 章详述，此机制原理简单，但在细胞

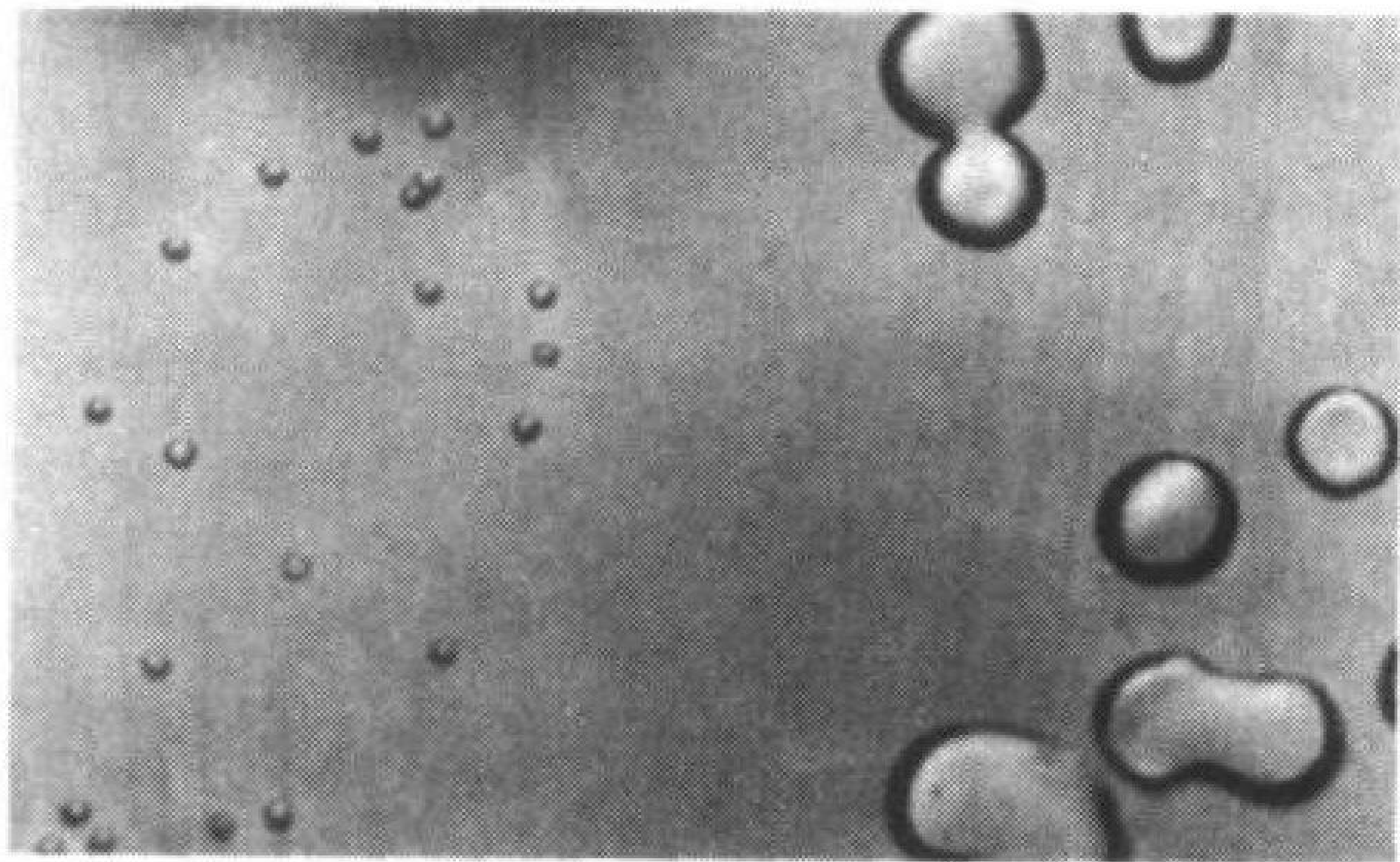


图 3-13　转化的肺炎双球菌

大菌落是致病型肺炎双球菌，它是将致病菌 DNA 提取物导至非致病菌（小菌落）中转化而来的。我们现在知道致病菌中的 DNA 含有非致病菌缺乏的一个基因。[引自 Avery，O，T.，Macleod，C.M.，and McCarty，M.J，Exp. med.79，159(1944)．Rakefeller Univertity Press 复制]

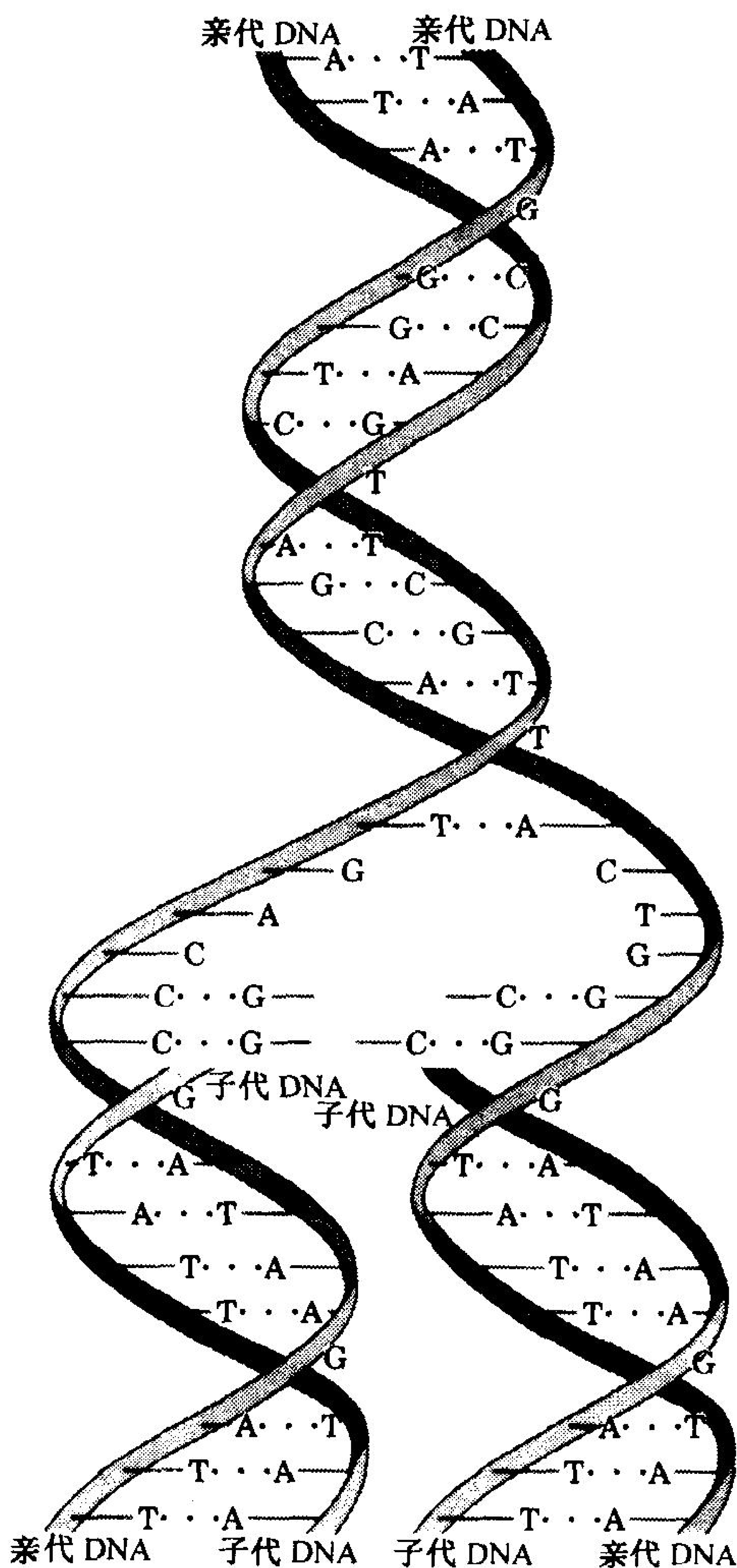


图 3-14　DNA 的复制

亲代 DNA 的每条链作为模板合成互补的子链。这样产生的双链分子与亲代一样。

内是一个非常复杂的过程，并且需要许多细胞因子准确而有效地参与。

B. 基因指导蛋白质合成

核苷酸序列如何控制有机体特性的问题需要花费很长的时间去解答。在 20 世纪 40 年代的粗糙脉孢菌模型实验中，George Beadle 和 Edward Tatum 发现基因和酶之间有一种特殊的联系，一个基因一个酶的理论应运而生。Beadle 和 Tatum 展示经 X 射线照射而形成的粗糙脉孢菌的突变种需要附加营养才能生长。经推测，受射线损害的子代细胞缺乏合成此类营养的必需酶。

DNA 和酶（几乎所有的酶都是蛋白质）之间的连接为 RNA。根据 1958 年由 Crick 提出的**分子生物学中心法则**（central dogma of mlecular biology），DNA 可以指导自身复制，能**转录**（transcript）形成具有互补序列的 RNA，此 RNA 序列再经**翻译**（translate）成相应氨基酸序列而形成蛋白质（图 3-15）。正如子链 DNA 以亲代 DNA 链为模板通过碱基互补配对原则由游离脱氧核苷酸聚合而成一样，RNA 链则以一个基因中的一条 DNA 链为模板，通过碱基互补配对原则由游离的核苷酸聚合而成（第 25 章将详述转录过程）。编码蛋白的基因所转录的 RNA（称为**信使 RNA** 或 **mRNA**）到达**核糖体**（ribosome），这是一个由大量 RNA（**核糖体 RNA** 或 **rRNA**）构成的细胞器。

在核糖体里，mRNA 每三个核苷酸为一个单位，与小 RNA 分子(**转运 RNA** 或 **tRNA**)的三个核苷酸发生互补配对(图 3-16)。每一个 tRNA 分子与一个氨基酸分子相匹配。核糖体催化氨基酸掺入形成蛋白质单体(第 26 章详述蛋白合成)。根据 tRNA 分子与 mRNA 结合的顺序，氨基酸被加到正在延伸的蛋白质链上。因为 mRNA 的核苷酸序列反映了基因中的核苷酸序列，所以说 DNA 指导蛋白质合成。也就是说，某一生物物种遗传物质发生了**突变**(mutation)，可以通过表达新的结构和功能的蛋白质而表现出来。

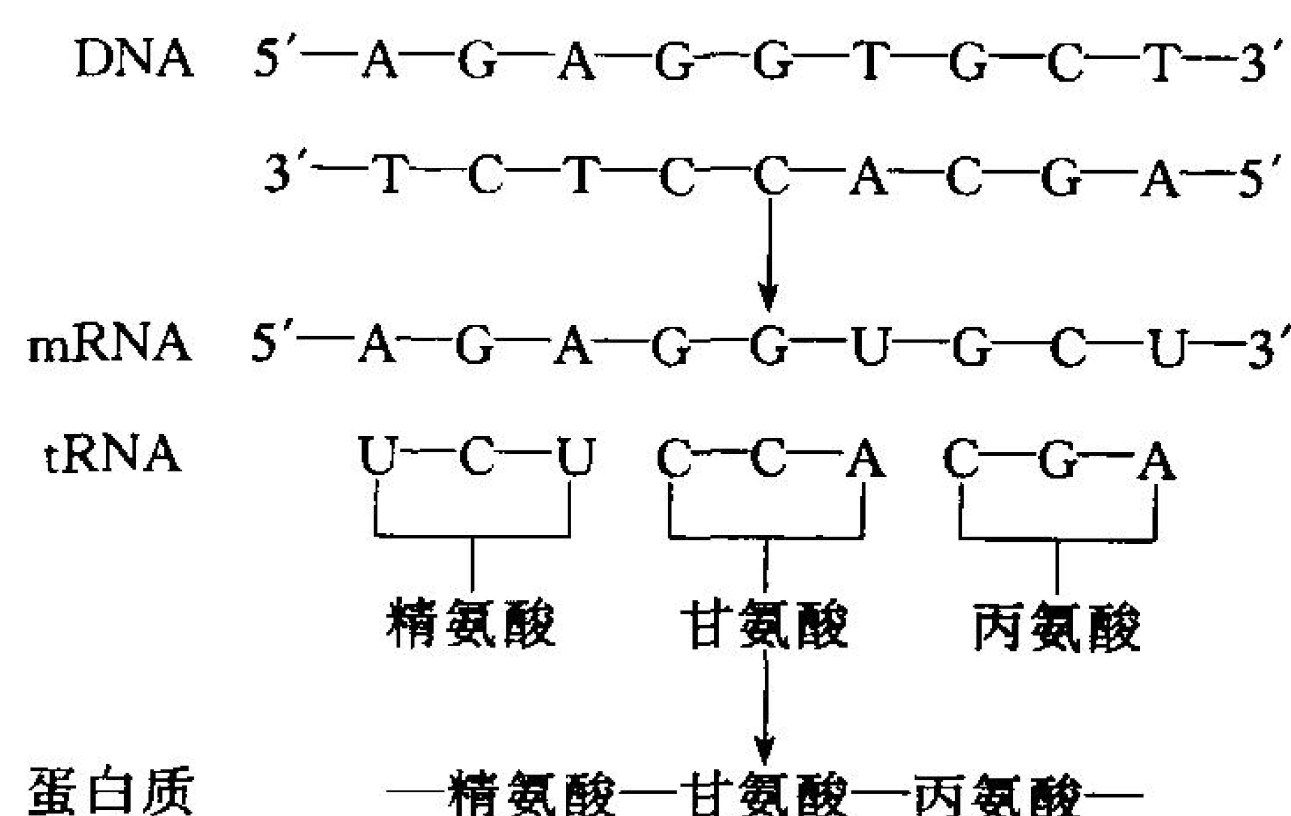


图 3-15 转录和翻译

DNA 的一条链指导信使 RNA(mRNA)的合成。转录得到的 RNA 序列的碱基与 DNA 链的碱基互补。当 tRNA 和 mRNA 每三个核苷酸片段间进行碱基互补配对时，信息被翻译。每个 tRNA 携带一个特定氨基酸，这些氨基酸共价地连接形成蛋白质。这样，DNA 中的碱基序列就限定了蛋白质中的氨基酸序列。

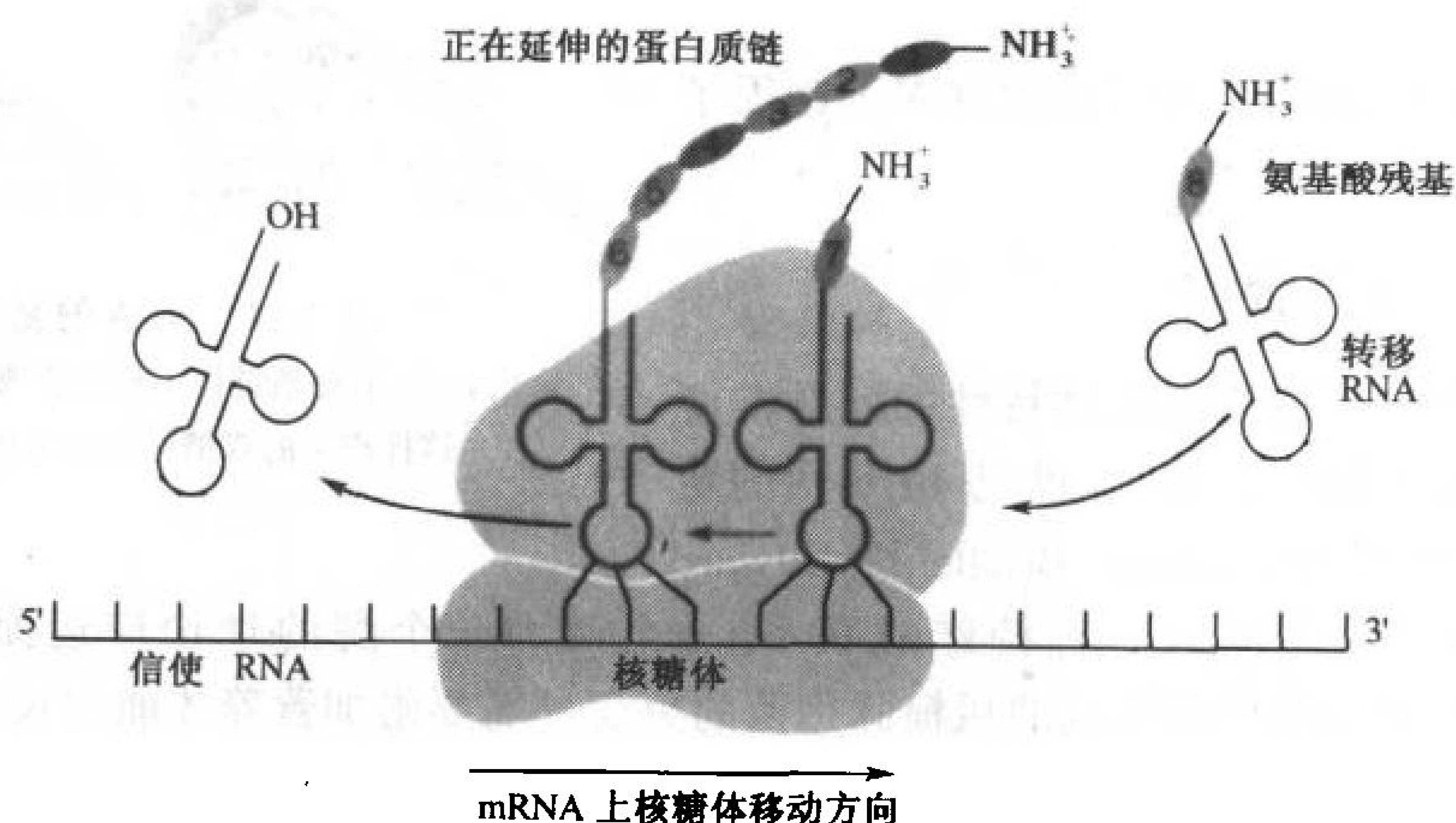


图 3-16 翻译

携带有氨基酸的 tRNA 与 mRNA 上互补三核苷酸序列结合。核糖体促进 tRNA 和 mRNA 的结合并且催化氨基酸连接形成蛋白质链。当一个新氨基酸被加上，则前一个 tRNA 被释放，并且核糖体沿着 mRNA 前进。

C. RNA 世界

共价连接氨基酸的化学反应是由 rRNA(节 26-4B)催化的,这是一个 RNA 催化剂的例子,它在进化历史上已经存在数亿年。实验室里已合成出 RNA 分子,它可以发生许多化学反应,这些反应与复制 DNA、转录 RNA 和 tRNA 携带氨基酸所要求的反应相关。这些结果与前细胞生命世界是一致的。在前细胞世界中,RNA 分子作为生化催化剂的主力,有更重要的地位。如今 RNA 作为催化剂或许只是早期"RNA 世界"的遗迹。

蛋白质在很大程度上已经代替 RNA 作为细胞的催化剂,也许因为蛋白质有更多的化学功能。核酸是 4 种单体的聚合物,而蛋白质有 20 种氨基酸可供选择,其中一些氨基酸带有功能基团,例如,羟基、巯基、氨基和羧基(节 4-1C),而这些基团并不存在于核酸中。相对于核酸,蛋白质功能基团更加扩展的功能使得蛋白质在进化中有更具竞争性的优势。

56

4. 核酸测序

目前我们对大多数蛋白质的结构和功能的认识,不仅依赖于由蛋白质本身所获取的信息,而且还间接来自它们的基因。*确定核酸中核苷酸序列的方法,使得推算出它们所编码蛋白质的氨基酸序列成为可能,并且在某种程度上能进一步推断这些蛋白质的结构和功能。核酸测序也可以揭示遗传调控的相关信息。*基因中某些部分,虽然不能转录成 RNA,但影响了基因转录和翻译的效率,也就是**表达**(express)。而且,阐明迄今 DNA 中未知图谱区域的序列可以发现新的基因和新的调控因子。*一旦一个核酸的序列可以被复制、修饰和表达,使得研究在常规方法中无法得到有效量的蛋白便成为可能。*在这一节里,我们将详细叙述核酸怎样测序和核酸序列会揭示什么样的信息。在下一节,我们将讨论用于各种目的纯化核酸的测序操作方法。

测定不同单体聚合物序列的一般步骤:

1) 将聚合物断裂成可以被完全测序的特异片段。
2) 确定每个片段中残基的顺序。
3) 确定每个片段在原始聚合物中的顺序:通过重复上面的降解程序步骤,产生可覆盖第一次切割位点的另一组片段。

RNA 测序的第一次尝试是使用非特异性的酶产生相对小的片段,然后这些核苷酸小片段被酶部分地消化,这些酶可以选择性地从一端去掉核苷酸,从而可以确定它们的核苷酸组成(图 3-17)。用这种方法测定 RNA 序列是很乏味的,而且很耗时。采用这种方法,Robert Holley 花了 7 年时间才测定出一个含有 76 个残基的 tRNA 分子的序列。

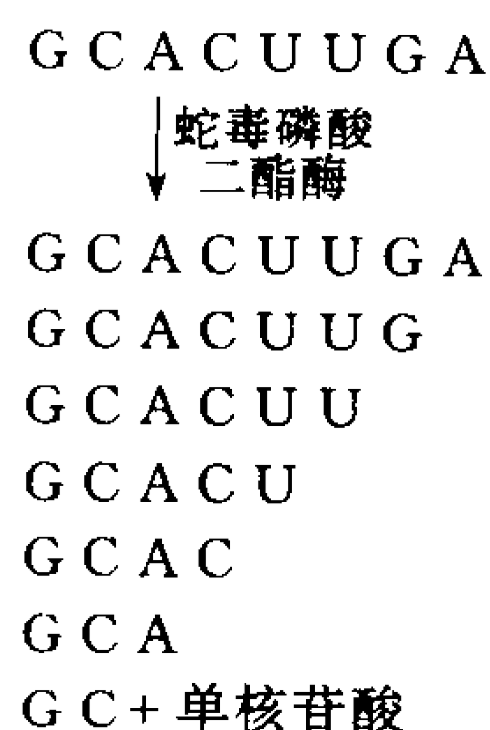


图 3-17　测定一个寡核苷酸序列

这个寡核苷酸被蛇毒磷酸二酯酶部分降解,磷酸二酯酶从寡核苷酸 3′末端开始切断核苷酸残基间的磷酸二酯键,降解得到了不同长度的片段混合物,分离这些片段,比较二个只相差一个核苷酸的片段的组成,从而确定大片段的 3′末端核苷酸,通过分析每一对片段就能获得最初的寡核苷酸序列。

1975 年以后,在核酸测序技术上有了突破性的进展。主要是 DNA 限制性内切核酸酶(可以在特殊位点上切割核酸)的发现和 DNA 快速测序技术的发展。现代分子克隆技术(节

3-5)的出现使生产足够量特定的 DNA 用来测序成为可能。大部分特定的 DNA 在基因组里通常是单拷贝,所以分子克隆技术必不可少。

A. 限制性内切核酸酶

许多细菌通过**限制性修饰系统**(restriction-modification system)可以抵抗**噬菌体**(bacteriophage,一种特异作用于细菌的病毒)的侵染。细菌通过用**修饰性甲基化酶**催化反应加上一个甲基($—CH_3$)来修饰它自身 DNA 特异序列上的某些核苷酸,像甲基化酶那样,限制性内切核酸酶可以识别相同的核苷酸序列,然后切断任何未经甲基化修饰的 DNA 中的至少一条链。[**内切核酸酶**(endonuclease)从多聚核苷酸链内部来切割核酸;**外切核酸酶**(exonuclease)通过去除其末端的残基来切割核酸。]这个系统能破坏含有一个没有被甲基化修饰的识别位点的外源(噬菌体)DNA。宿主 DNA 经常是一半被甲基化,因为尽管子链在被合成的短期内没有甲基化,但母链是早已被修饰的(这样可以保护 DNA 双链,避免被限制酶切割)。

57

II 型限制性内切核酸酶在实验室中有独特用处。这些酶切割 DNA 位点序列长度为 4~8 个碱基,这些位点同时也可以被相应修饰性甲基化酶识别。(I 型和 III 型限制性内切酶都可以切割 DNA 内它们识别序列以外的位点)。大约有 2500 种 II 型限制酶和相应的大约 200 种不同的识别序列已经被确定。表 3-3 中列举了广泛使用的几种限制酶。限制酶的命名规则如下:产

表 3-3 部分 II 型限制酶的识别和切割位点

限制酶	识别序列[a]	微生物
Alu I	AG↓C*T	*Arthrobacter luteus*
Bam HI	G↓GATC*C	*Bacillus amyloliquefaciens* H
Bgl I	GCCNNNNN↓NGGC	*Bacillus globigii*
Bgl II	A↓GATCT	*Bacillus globigii*
Eco RI	G↓AA*TTC	*escherichia coli* RY13
Eco RII	↓CC*($^{A}_{T}$)GG	*escherichia coli* R245
Eco RV	GA*T↓ATC	*escherichia coli* J62P4G74
Hae II	RGCGC↓Y	*Haemophilus aegyptius*
Hae III	GG↓C*C	*Haemophilus aegyptius*
Hin dIII	A*↓AGCTT	*Haemophilus influenzae* R_d
Hpa II	C↓C*GG	*Hacmophilus parainfluenzae*
Msp I	C*↓CGG	*Moraxella* species
Pst I	CTGCA*↓G	*Providencia stuartii* 164
Pvu II	CAG↓C*TG	*Proteus vulgaris*
Sal I	G↓TCGAC	*Streptomvces albus* G
Taq I	T↓CGA*	*Thermus aquaticus*
Xho I	C↓TCGAG	*Xanthomonas holcicola*

[a] 识别序列仅用一条链简略表示,方向是从 5′→3′。切割位点用箭头(↓)表示,并且修饰的碱基用星号表示(A*是 N^6-甲基腺嘌呤,C*是 5-甲基胞嘧啶)。R, Y 和 N 分别表示嘌呤核苷酸,嘧啶核苷酸和任意核苷酸。

来源: Roberts, R.J. and Macelis, D., REBASE—限制酶数据库, http://www.neb.com/rebase。

生它的细菌的属的第一个字母和种的头两个字母,后面跟有血清型或者细菌系(如果有的话),如果这个细菌系产生不只一种限制酶,还要加上罗马数字。例如,*Eco*RI 是由 *E.coli* 菌系中的 RY13 菌株系所产生的。

有趣的是,大部分 II 型限制性内切核酸酶识别和切割回文 DNA 序列。所谓**回文**(palindrome)是指顺读和倒读都一样的词语或片段。举两个例子:"refer"和"Madam, I'm Adam"。在一段回文 DNA 序列片段中,每条单链中的核苷酸序列是相同的,因此片段可以说是双重对称的(图 3-18)。大部分限制性内切核酸酶切割 DNA 的两条链时,其作用位点是交错的,这样产生的 DNA 片段具有互补的单链突出端。带有这种**黏性末端**(sticky end)的限制片段,可以和被同种限制酶切的其他片段通过碱基配对相连接。另外一些限制性内切核酸酶在对称轴处切割双链 DNA,产生**平末端**(blunt end)。

58

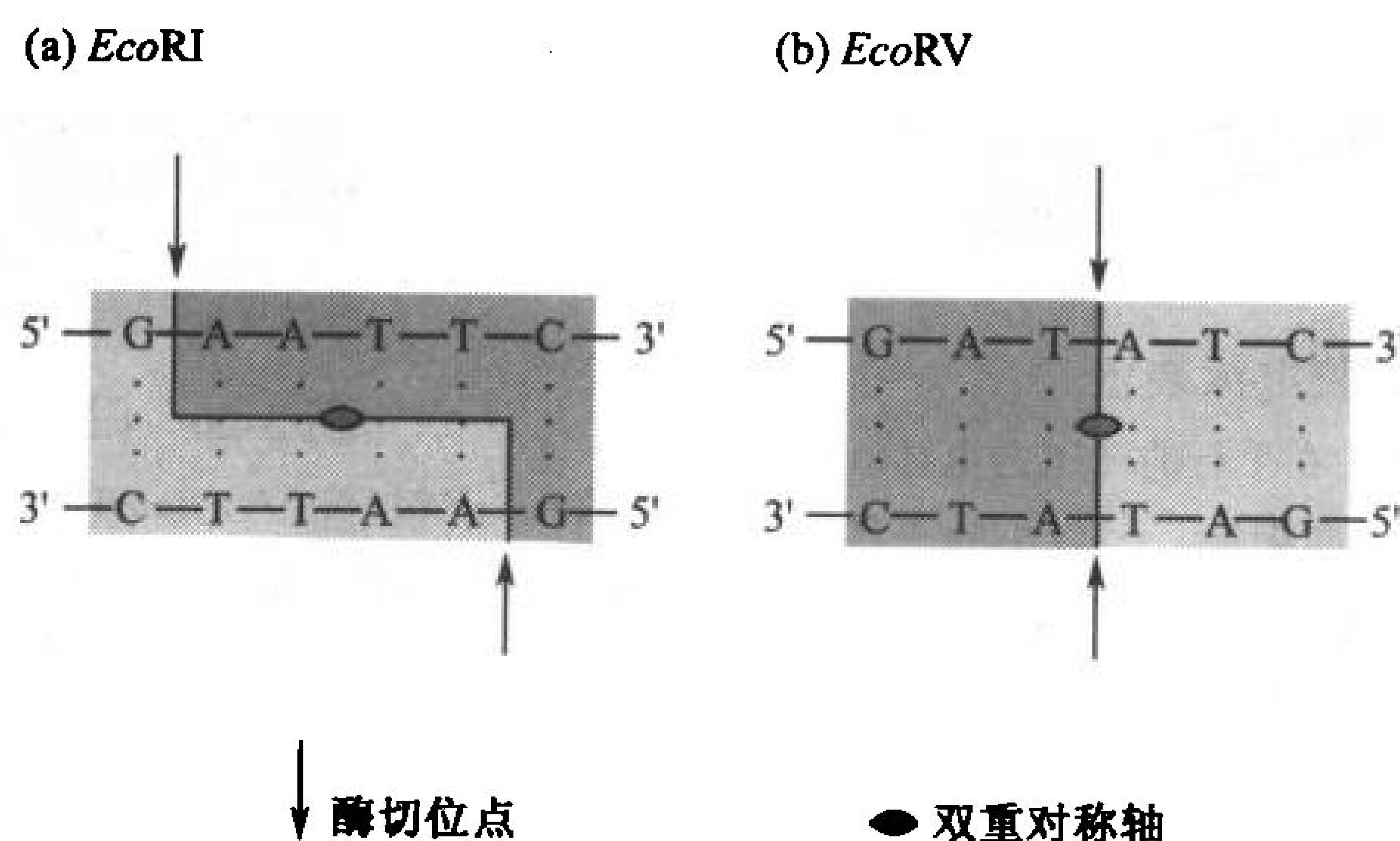


图 3-18　限制位点

II 型限制性内切核酸酶的识别序列是一个回文结构,该序列具有双重对称轴。(a)*Eco*RI 的识别位点,此位点切割产生的 DNA 片段带有黏性末端。(b)*Eco*RV 的识别位点,在此位点切割产生的 DNA 片段带有平末端。

B. 电泳和限制酶酶切图谱

用限制性内切核酸酶处理 DNA 可产生一系列能被准确鉴定的片段,这些片段可根据其大小而被分开。**凝胶电泳**(gel electrophoresis)是最常用的一种分离方法。其原理是:一个带电的分子在电场内移动的速度和它的电荷密度、大小及形状是成比例的。对于具有相似成分的分子,例如核酸,形状和电荷密度是一致的,所以其电泳速度决定于其大小。电泳所用的凝胶通常是**琼脂糖**(agarose,带有疏松孔径的糖聚合物)或**聚丙烯酰胺**(polyacrylamide,一种更为紧密交联的合成聚合物)。凝胶通常被放置在两块玻璃或塑料板之间(图 3-19),也可以是薄层凝胶水平铺在支持物表面。将欲分离的分子加于凝胶的一端,在电场的作用下,分子中穿过基质小孔径发生移动。在给定的时间内,小分子移动得更快,因此迁移得更远。

电泳之后,通过适当的技术,可以观察到凝胶上被分开的分子。比如,加入可以和 DNA 紧密结合的染料或者放射性标记。依据凝胶的尺寸和可视技术的使用,即使纳克级的样品也能被凝胶电泳分离和检测到。几个样品也可以同时进行电泳。例如,用不同的限制性内切核酸酶

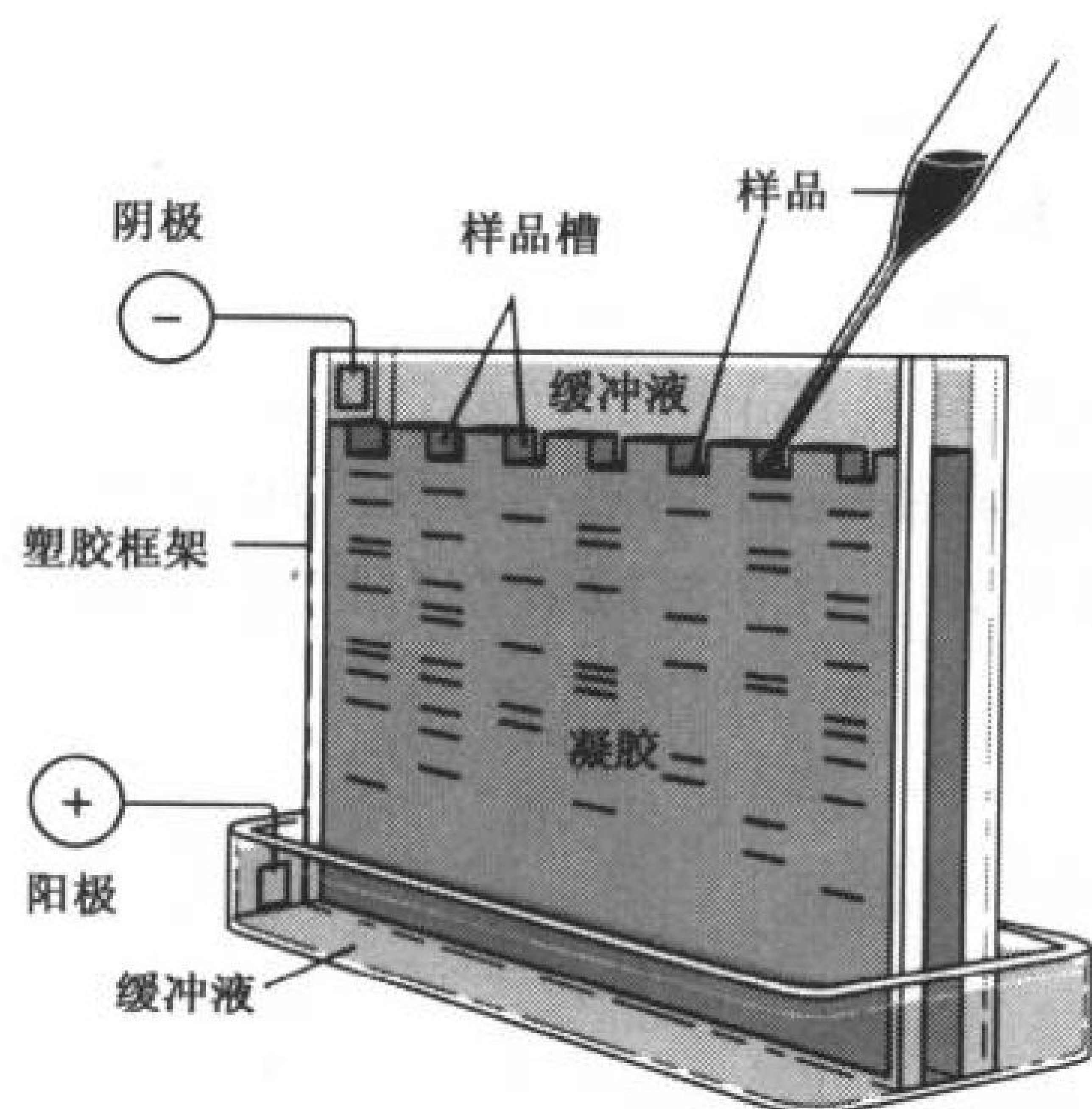


图 3-19 凝胶电泳装置

样品被加在凝胶顶端的槽内，在平行的泳道内电泳。在电场中，DNA分子由阴极移向阳极。因为小分子移动相对较快。在每一个泳道内的DNA分子均按照大小分开。在电泳结束后，被分离的分子可通过染色、荧光或放射自显影技术观测到。

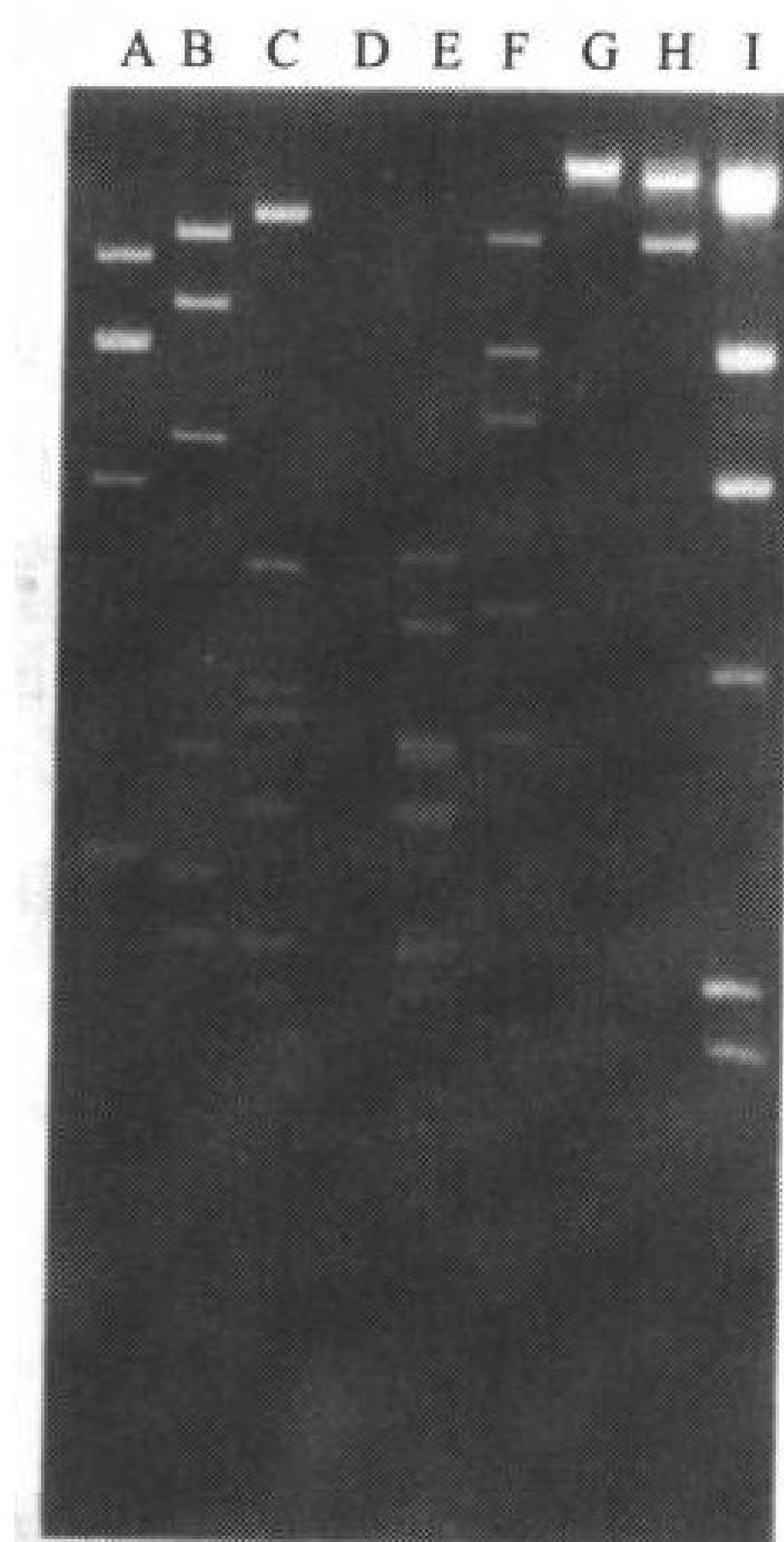


图 3-20 限制酶切电泳图

质粒 pAgK84 被(A)*Bam*HI，(B)*Pst*I，(C)*Bgl*II，(D)*Hae*III，(E)*Hinc*II，(F)*Sac*I，(G)*Xba*I 和 (H)*Hpa*I 降解。在泳道 I 内放入被 *Hin*dIII 降解的 λ 噬菌体 DNA(已知大小)作为标准。通过荧光技术，在每一个泳道内的限制片段可被观察到。[引自 Slota, J.E. and Farrand, S.F., Plasmid, 180(1982). 1982 由 Academic Press 复制]

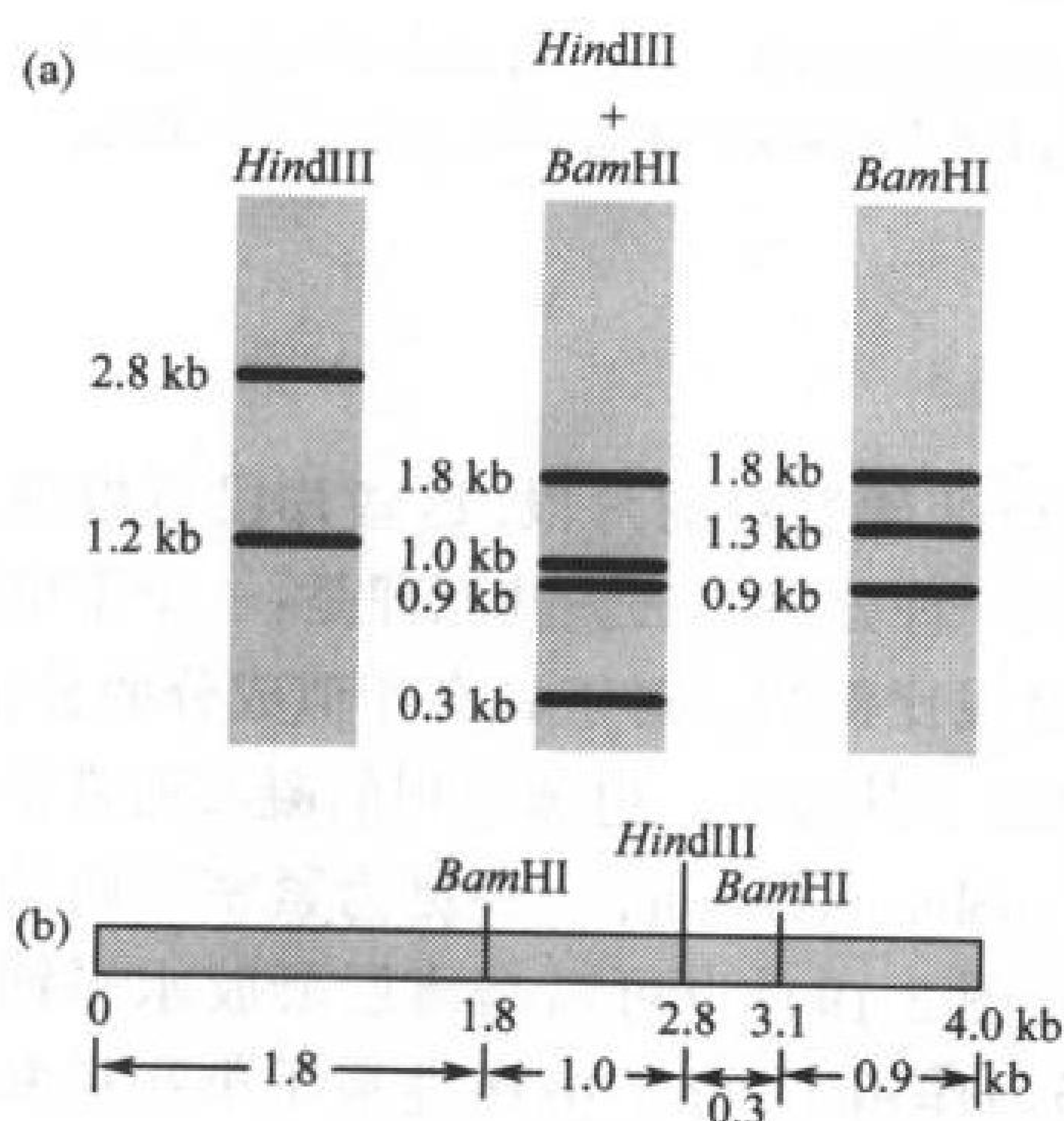


图 3-21 限制酶图谱的构建

(a) *Hin*dIII，*Bam*HI 和其混合物分别降解一个 4kb 大小的 DNA 分子(假设)，得到凝胶电泳样品。各种片段的大小已经被鉴定。(b) 由图 a 所得限制酶 DNA 图谱，限制位点间的距离对应着相应限制片段的大小。

切割 DNA 样品获得的片段，可以通过电泳同时被观测到(图 3-20)。通过比较它们和已知大小片段的迁移率，可以判定这些未知片段的大小。

凝胶电泳的结果，如图 3-20 所示，可以用来构建一种图，称之为**限制酶图谱**(restriction map)。举例来说，一个 4kb 大小的线性 DNA 分子，用 *Bam*HI、*Hin*dIII，或两者同时切割，并且通过凝胶电泳分离(如图 3-21a)。限制片段的大小可以推断出原始 DNA 中限制位点，并且构建限制酶图谱(如图 3-21b)。限制酶图谱是有用的实验室工具，因为限制位点在 DNA 分子中是一个物理参照点。因此限制酶图谱对于在染色体上定位特殊的碱基序列或基团以及比较不同的染色体来说，是一个便利的工作平台(见框 3-1)。

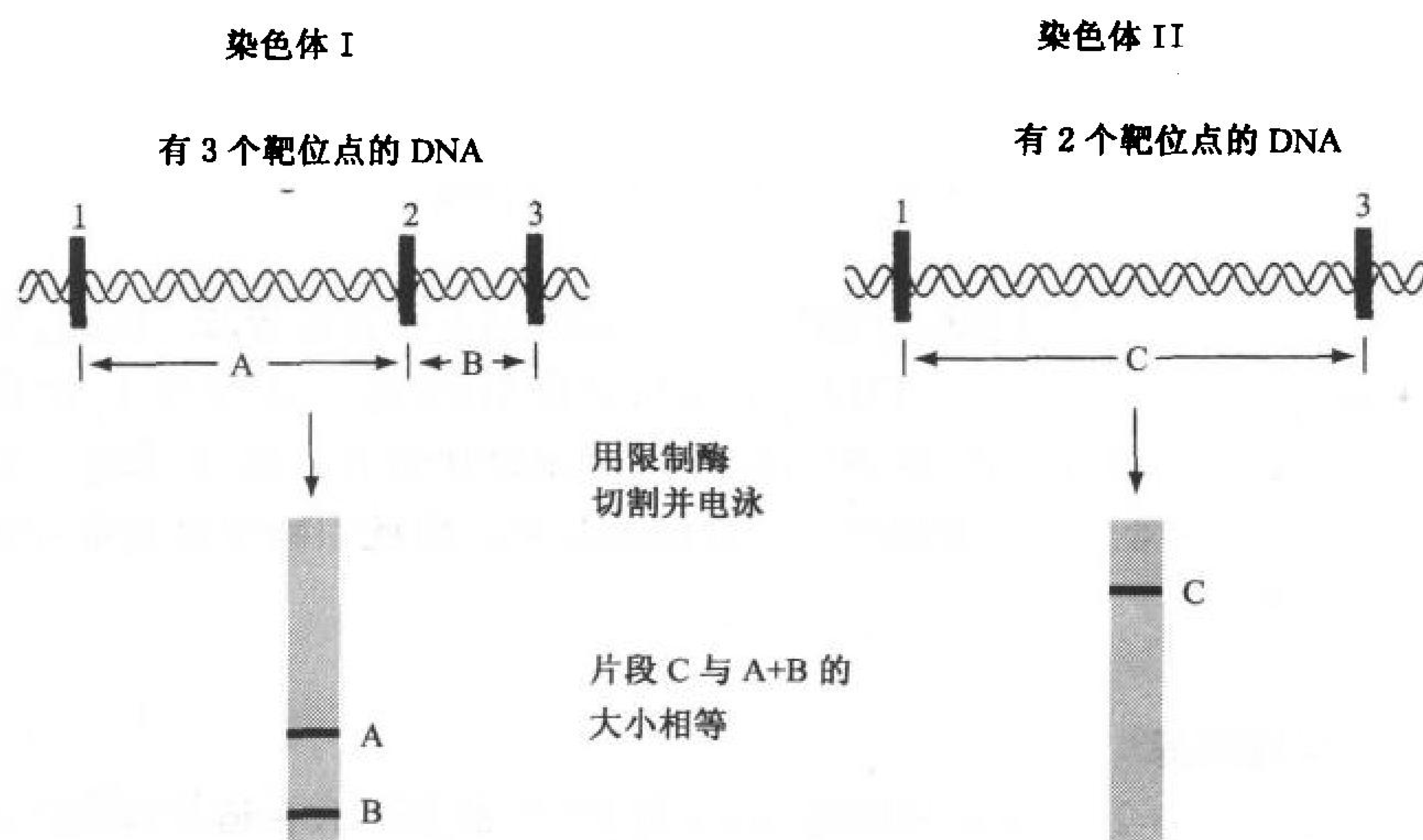
框 3.1 生物化学焦点

限制性片段长度多态性(RFLP)

人类和其他物种的个体差异来源于他们高度遗传的多态性。人的同源染色体(父源和母源染色体对)在序列上平均每 200～500bp 就有差异。这些遗传性的差异产生或消除了限制位点。因此用限制酶切同源染色体可以获得不同大小的片段；也就是说，这些 DNA 表现出**限制性片段长度多态性**(RFLP)。

这儿给出两条带有不同限制位点数目的同源染色体片段。一个个体有二拷贝染色体 I 在 RFLP 分析中，可以产生 A、B 两个片段，而有二个染色体 II 拷贝的个体只产生片段 C。如一个个体同时带有上述两个染色体，将产生片段 A、B 和 C。

RFLP 对于鉴定未知的遗传性基因缺陷型疾病具有重要意义。如果把一个特定的 RFLP 和一个缺陷基因紧密相连，在个体中检测到这个 RFLP 就说明，这个个体在很大程度上可能带有缺陷基因。例如，Huntington 病(致命的神经系统紊乱)，这种病的症状最早发生在 40 岁左右，是由显性遗传缺陷引起的。与 Huntington 病基因紧密相关的 RFLP 片段已被鉴定，这就可以通知有这种疾病的患者(他们的子女有 50％的患病可能)的子女，以调整他们的生活。



C. 链终止测序法

Allan Maxam 和 Walter Gilbert 设计了第一种专门测定长链 DNA 的化学切割方法。然而，这个技术已经被 Frederick Sanger 发明的**链终止测序法**(chain-terminator procedure)所替代，下面我们将讨论这个方法。DNA 测序中的第一步是要获得单链多核苷酸链。互补的 DNA 双链可以通过热变性分开，加热可以断裂互补碱基之间的氢键。然后，产生多聚核苷酸片段(这些片段分别终止于 4 种不同的核苷酸)。最终，这些片段被分离和鉴定。

链终止法使用 DNA 聚合酶

链终止法[又称**双脱氧法**(dideoxy method)]用一种 *E.coli* 的酶去合成要被测序的单链DNA的互补链，此酶为 **DNA 聚合酶 I** 的一个片段，DNA 聚合酶 I 参与复制细菌 DNA(节24-2A)。用单链 DNA 为模板，DNA 聚合酶 I 将 4 种三磷酸核苷酸(dNTP)，dATP、dCTP、dGTP和 dTTP 组装成它的互补链，由 5′→3′方向延伸合成(图 3-22)。

60

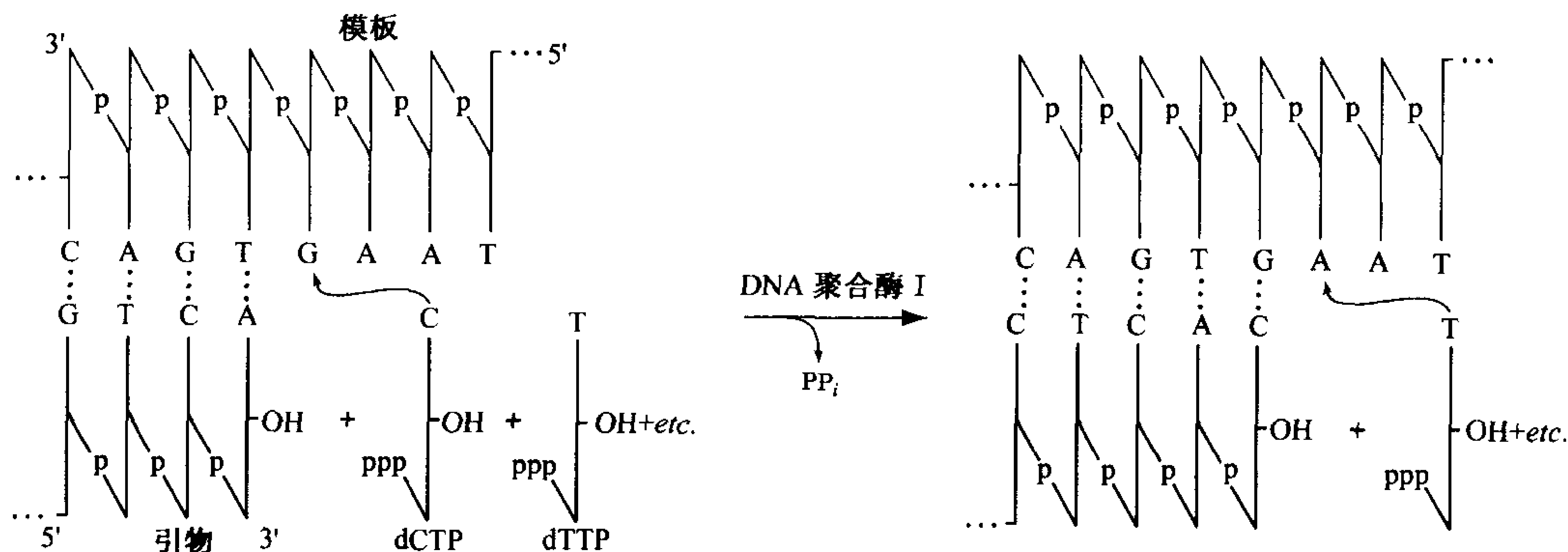


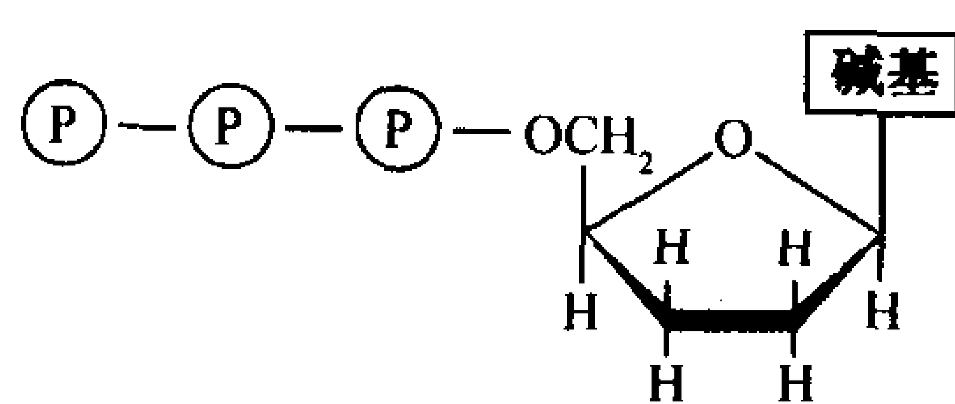
图 3-22 DNA 聚合酶 I 的作用

使用单链 DNA 为模板，酶不断地把互补的核苷酸加在引物上，加入的核苷酸与模板链的碱基配对并以 5′→3′方向连接到伸长的多核苷酸链上。这个由聚合酶催化的反应需要生长链上有游离的 3′-OH 基团。每增加一个核苷酸就释放出一个焦磷酸 ($P_2O_7^{4-}$，PP_i)。

DNA 聚合酶 I 可以从一条多聚核苷酸的 3′末端连续添加脱氧核苷酸。因此，在一段短的多聚核苷酸链[**引物**(primer)]存在下开始复制，引物与模板 DNA 的 3′末端互补，而成为新链的 5′末端。引物和模板链的碱基互补配对，然后核苷酸有序地加到引物的 3′末端。如果被测序的DNA 是一个限制片段，通常它的起点和终点带有限制位点。因此引物可以是带有这种限制位点序列的小的 DNA 片段。

DNA 合成终止于特殊碱基

在链终止技术中(图 3-23)，将要测序的 DNA 与 DNA 聚合酶 I、合适的引物和 4 种 dNTP 底物一起孵育，进行聚合反应。反应混合物中也包括一个标记物，可以是一种 dNTP 或是引物。可以用放射同位素方法(例如^{32}P)或者荧光标记方法进行标记，使得聚合产物容易被检测到。



2′,3′-双脱氧核苷三磷酸

61

反应混合物的关键成分是少量的 **2′,3′-双脱氧核苷三磷酸(ddNTP)**，它们是脱氧核苷酸的 3′-OH 上脱氧形成的。当双脱氧类似物替代相应的正常核苷酸而加到多聚核苷酸链上时，链的延长将被终止，因为下一个核苷酸需要一个自由的 3′-OH 才能再连接上。通过使用少量的 ddNTP，可以产生一系列截短的 DNA 链，它们的末端都为相应碱基的双脱氧类似物。

分为 4 组反应混合物，每组的量大致相同，并且加入不同的 ddNTP，然后将反应产物在 4 个泳道做平行电泳。各条截短链的长度表明双脱氧核苷酸插入的位置。这样，复制链的序列可以直接从凝胶中读出(图 3-24)。凝胶必须有足够的能力来分开这些只差一个核苷酸长度的片段。

62

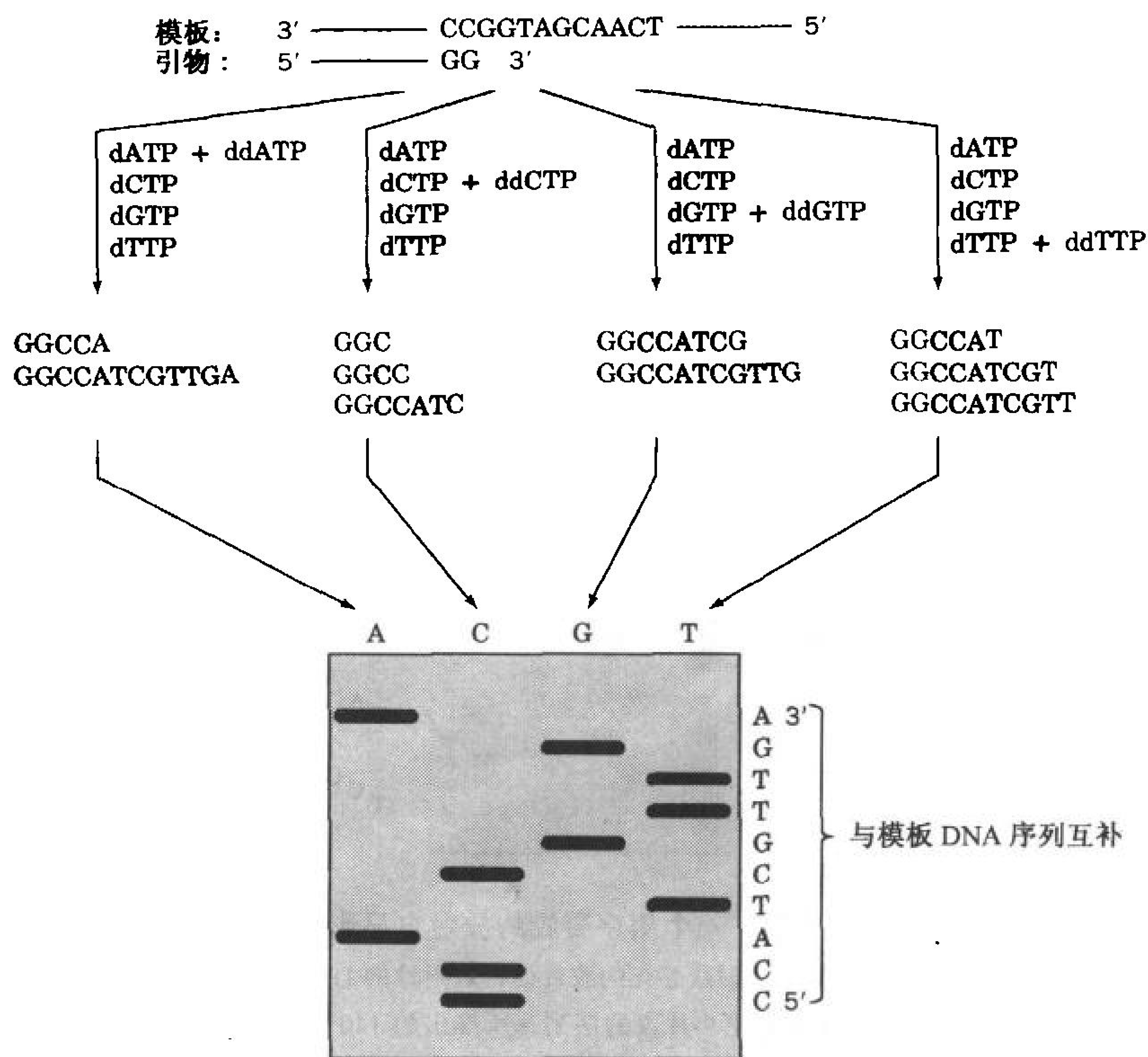


图 3-23　链终止(双脱氧)DNA 测序

4 种反应混合物中都包括：待测的单链 DNA、引物、4 种脱氧核苷三磷酸和 4 种双脱氧核苷三磷酸中的一种。通过 DNA 聚合酶延伸引物，终止于带有双脱氧核苷酸的末端，将获得的混合物进行凝胶电泳。从最小片段读到最大片段所得序列即为模板 DNA 的互补序列。

两组凝胶(其中一组比另一组跑更多的时间)可以得到 800 个碱基的 DNA 序列。注意，通过链终止法所得到的序列和被测的 DNA 是互补的。

自动测序

通过自动测序，可以使大规模的测序工作加快进行。与链终止法不同的是，在 4 种链延伸反应中所使用的引物都分别带有不同的荧光染料。4 种延伸反应分开进行，然后把它们的产物混合，在凝胶电泳的一个泳道中电泳。每条片段的末端碱基可以通过特征荧光而被鉴定(图3-25)。用计算机控制的荧光检测仪和自动测序系统，每天可鉴定约 10 000 个碱基，而人工方法每年才能鉴定约 50 000 个碱基。

核酸测序已经成为常规方法，这使得测定一种蛋白质基因的碱基序列比测定这种蛋白质的氨基酸序列(节 5-3)要容易得多。事实上，核酸测序对于研究那些尚未鉴定其产物的基因极为重要。如果基因能被测序，那么通过和已知特征蛋白的基因碱基序列进行比较，可以推断它所编码的蛋白的可能功能。人类遗传学的一个重要进展，就是分离与囊性纤维增生(一种常见的遗传病)相关的基因。1989 年，当 Francis Collins 鉴定出了这个基因的时候，对任何关于正常基因的产物或者缺失基因的蛋白如何导致这种疾病都一无所知。通过测定核酸序列，并推出它的氨基

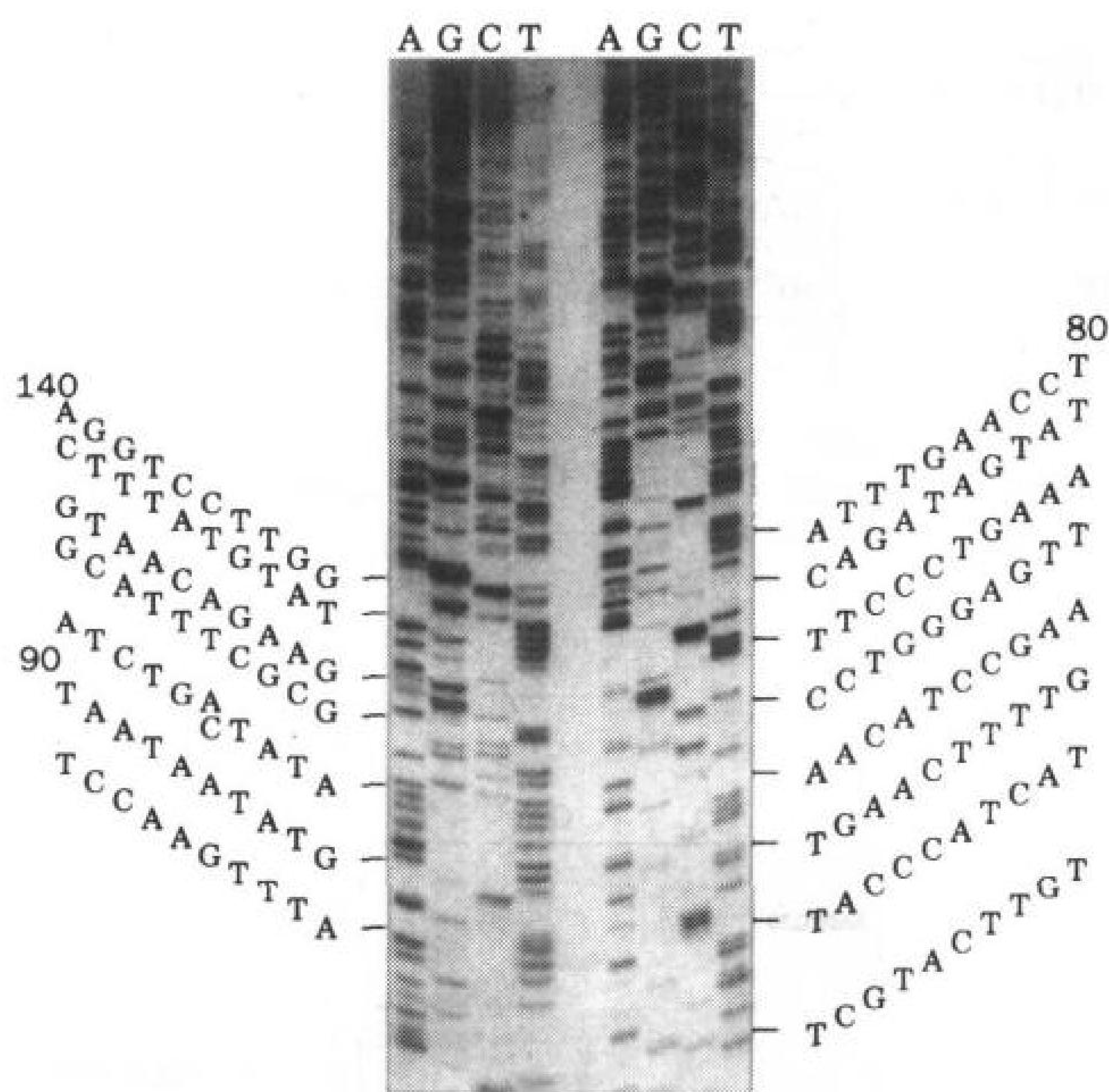


图 3-24 一个测序凝胶的放射自显影图

链终止法获得 DNA 片段，电泳后，通过 X 射线感光的胶片使得放射性的 DNA 片段显像。在第一次加样 90 分钟以后二次加样(右边的泳道)，以便获得更小片段的序列。所推出的 140 个核苷酸序列写在图的边上[引自 Burdon, R.H. (Eds.), Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol.10, p.82, Elsevier (1983)。经允许使用]

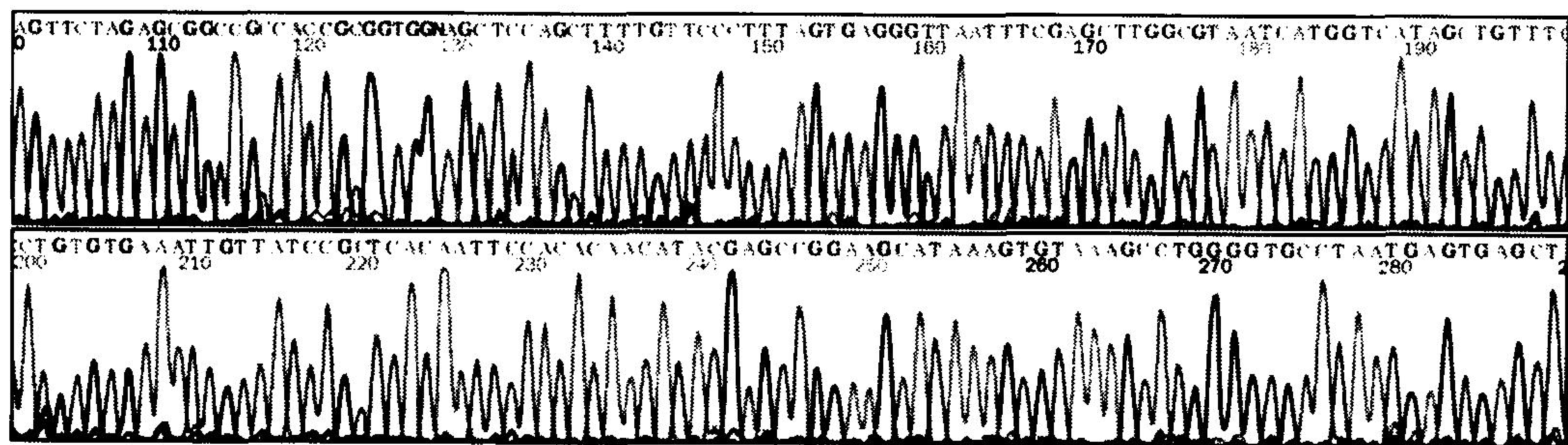


图 3-25 DNA 自动测序

在此技术中，4 个链终止法反应混和物中，引物分别带有不同的荧光染料。4 个反应所得的产物混合后进行电泳。每一种颜色的波形代表了包含一种双脱氧核苷酸的片段：绿色、红色、黑色和蓝色分别对应 ddATP、ddTTP、ddGTP 和 ddCTP。每一个寡核苷酸的 3′-末端碱基通过凝胶带的荧光而被鉴定。此图所示为某段被测的 DNA 片段，相当于 100～290 个核苷酸的序列。(引自 Mark Adams, The Institute for Genomic Research, Rockville, Maryland)

酸序列后，Collins 认为这个基因编码一种跨膜蛋白，当这种蛋白缺乏时，将导致呼吸道和肠道中氯离子分泌不正常。

核酸测序技术的出现引发了测定全部人类基因组的梦想。尽管它是一个巨大的计划，而且需要自动测序仪器不断增加精确度和速度，但这个目标在未来的几年内将会达到。测定人类基

因组的努力引发了一系列测定其他简单生物基因组的计划;并且这些计划中的一些已经完成(表 3-4)。

表 3-4　一些基因组计划

物　　种	基因组大小/kb	染色体数目
Mycoplasma genitalium[a]（人类寄生虫）	580	1
Rickettsia prowazekii[a]（推测与线粒体有关）	1200	1
Methanococcus jannaschii[a]（嗜热产甲烷菌）	1700	1
Haemophilus influenzae[a]（人类病原体）	1830	1
Synechocystis sp.[a]（蓝藻类细菌）	3570	1
Escherichia coli[a]（人类共生菌）	4600	1
Saccharomyces cerevisiae[a]（面包酵母）	12 100	16
Plasmodium falciparum（引起疟疾的原生动物）	27 000	14
Caenorhabditis elegans[a]（线虫）	100 000	6
Arabidopsis thaliana（双子叶植物）	120 000	5
Drosophila melanogaster（果蝇）	165 000	4
Danio rerio（斑马鱼）	1 700 000	25
Homo sapiens	2 900 000	23

[a] 测序完成。(注:为本书英文原版出版时已完成的测序)

D. 测序、突变和进化

或许核酸测序最主要的作用是它提供了关于分子进化机制的信息。DNA 的物理和化学性质,例如它规则的三维形状和完美的复制过程,都给人留下一种印象,认为它的遗传信息是相对稳定的。事实上,DNA 是一个动态的分子,也发生变化,改变遗传信息。例如,DNA 复制过程中的碱基错配会在子链中产生**点突变**(point mutation)。DNA 受到化学或放射性损伤会产生突变。遗传信息更广泛的改变是由于错误的**重组**(recombination,染色体之间 DNA 的交换)和基因**转座**(transposition,从一条染色体到另一条染色体,某些情况下可从一种生物到另一种生物)造成的。所有这些 DNA 改变为自然选择提供了原始的材料。当一个突变的基因被转录成 mRNA,然后被翻译,产生的蛋白也许会给个体带来某种优势。当这种有益的变化从一代传到下一代时,它便

成了此物种基本遗传组成的一部分。当然,许多改变是伴随物种进化发生的,这些变化并非都是简单的,也并非都是渐进的。

64 物种间的关系可以通过比较不同生物体中相似基因的序列而得到结论。在一个基因中,不同核苷酸的数目可以粗略反映生物体在进化上分开的程度。把原核生物重新分为古细菌和细菌(节 1-3A),是根据把所有生物体中存在的 rRNA 进行序列分析得出的结果。这反映了序列分析的作用。

核酸测序也显示出这样的结果,那就是在**表型**(phenotype,物理特征)上不同的物种,在分子水平上具有令人惊讶的相似性。例如,人和黑猩猩的 DNA 有 98%~99%是相同的。对于玉米及其假定祖先玉米草的研究表明,这两种植物仅仅在控制玉米粒成长部分的少数基因上存在差异(玉米草的玉米粒被不能食用的壳包裹,图 3-26)。

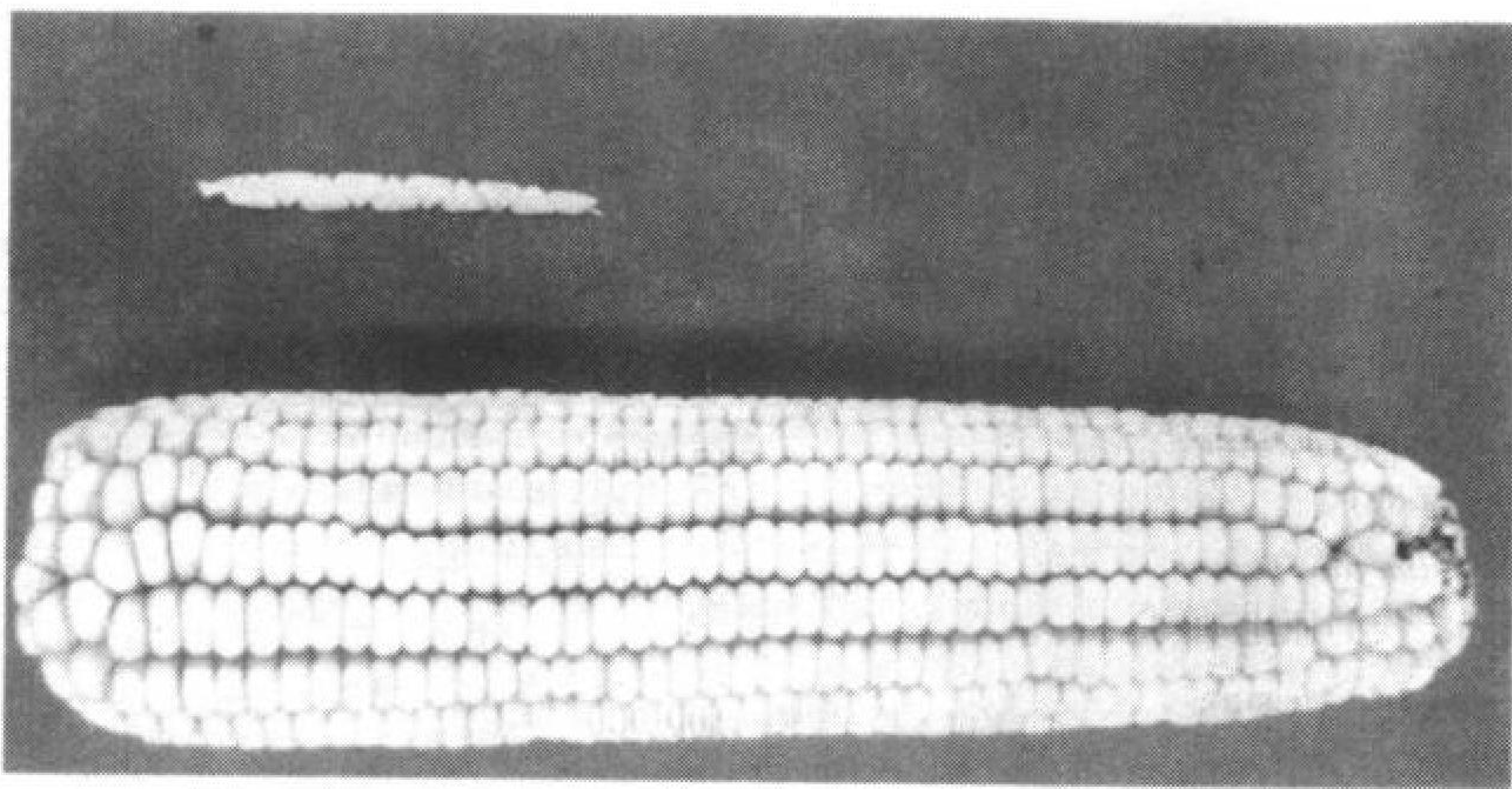


图 3-26 玉米和玉米草

尽管它们在表型上有巨大的差异——玉米(下)有数百粒易食用的玉米粒而玉米草(上)只有少量硬的、不可食用的玉米粒——但它们只有很少的基因是不同的。相信玉米是来源于玉米草的突变,使得玉米粒更加明显。

(引自 John Doebley/Visuals Unlimited)

DNA 中微小的突变会明显产生一个进化过程中的大跳跃。如果考虑到遗传信息的本质,这也许并不那么让人惊讶。在非编码蛋白片段中的变异或许会干扰细胞因子的结合,从而影响转录的时间。一个编码 RNA 的基因中的突变,也许会干扰影响翻译过程的因子的结合。即使是一个小的基因重排,都可能扰乱完整的发育过程,从而导致新物种的出现。尽管大部分突变将导致个体的适应力下降或者繁殖能力降低,遗传信息突变的能力与化石纪录是一致的。具有讽刺意义的是,化石纪录的不连续性,部分原因可能是由遗传信息的突变导致的,这种不连续性曾经一度用来否认达尔文进化论。

5. DNA 重组技术

与核酸测序一样,DNA 体外和体内(即试管和生物体)操作技术在生物化学、细胞生物学和

65 遗传学方面已经产生了令人难以置信的进展。在许多方面,**重组 DNA 技术**(recombinant DNA technology)已经使得纯化特定的 DNA 序列和制备足够研究数量的 DNA 成为可能。想要从大肠

杆菌中提取 1000bp 长度的染色体 DNA，要培养密度为 10^{10}个/ml 细胞的 10 L 培养液，其中仅含有约 0.1mg 的目的 DNA，而这就是用经典的方法所能得到的全部 DNA，再也不能分离出剩下的 DNA(节 5-2 和节 3-3)。重组 DNA 技术，也称**分子克隆**(molecular cloning)或者**基因工程**(genetic engineering)，使得特殊的 DNA 序列的分离、扩增和修饰成为可能。

A. 克隆技术

获得和扩增 DNA 片段的方法如下：

1) 使用限制性内切核酸酶获得适当大小的 DNA 片段并将其分离。
2) 将获得的 DNA 片段整合到称为**载体**(vector)的另一个 DNA 分子上，载体上具有指导 DNA 复制的必需序列。
3) 然后将带有目的基因(DNA)的载体导入受体细胞，在那里它可以复制。
4) 最终我们将这些包含有目的基因(DNA)的细胞进行鉴定或**筛选**(select)。

克隆(cloning)是指从一个原种获得许多相同的有机体。在这里，**克隆**(clone)是携带目的基因(DNA)的载体细胞的集合体。在合适的宿主细胞如 *E.coli* 或者酵母体内，可以产生大量插入的目的基因(DNA)。

克隆好的 DNA 可以被纯化和测序(节 3-4)。另外，如果一个克隆的基因连接在恰当的位点，即 RNA 和蛋白质合成的调控序列区，宿主就可以产生大量的由此基因编码的 RNA 和蛋白质。这样，克隆技术为其他研究工作提供了大量的核酸和蛋白，而且提供了一种在控制条件下研究基因表达的方法。

克隆载体

一系列小的、可以自我复制的 DNA 分子都可以作为克隆载体。在细菌和酵母细胞中发现的**质粒**(plasmid)是一个 1～200kb 长度的环状 DNA 分子。质粒可以被看作是分子寄生物，但是在很多情况下，它可以为宿主提供有益的功能，例如，它能增加宿主所缺少的抗生素的抗性。

有些种类的质粒在细胞中是单个拷贝或数量很少，而且仅在细菌染色体复制时，质粒才能复制。然而，克隆所用的质粒在每个细胞中存在数以百计的拷贝，并且能被诱导复制，直到细胞中含有 2000～3000 个拷贝(大约为细胞总 DNA 的一半)。实验室所构建的质粒相对比较小，容易复制，并且有一个或多个抗生素抗性基因，还包括一些便于定位的限制酶切位点，外源 DNA 可以插入到这些限制位点。质粒载体可以用来克隆不超过 10kb 的 DNA 片段。*E.coli* 质粒 pBR322(图 3-27)就是一个代表性的克隆载体。

λ 噬菌体(图 3-28)是一种可供选择的克隆载体，最大可以携带 16kb 的 DNA 片段。λ 噬菌体 48.5kb 的基因组中有三分之一对于其侵染是非必需的，因此可以被相近大小的外源 DNA 替代。所得到的**重组体**(recombinant)，或称为**嵌合体**(chimera，以希腊神话中的怪兽凯米拉命名)，被包裹进噬菌体颗粒，然后可以被介导进入宿主细胞。使用噬菌体作为载体的一个优点是可以产生大量易纯化的重组 DNA。

66

大到几百个 kb 以上的 DNA 片段则可以在**酵母人工染色体**(YAC)中进行克隆。YAC 是线性 DNA 分子，包括所有的染色体结构，这些结构在酵母分裂期对于酵母细胞的正常复制和分离是必需的。

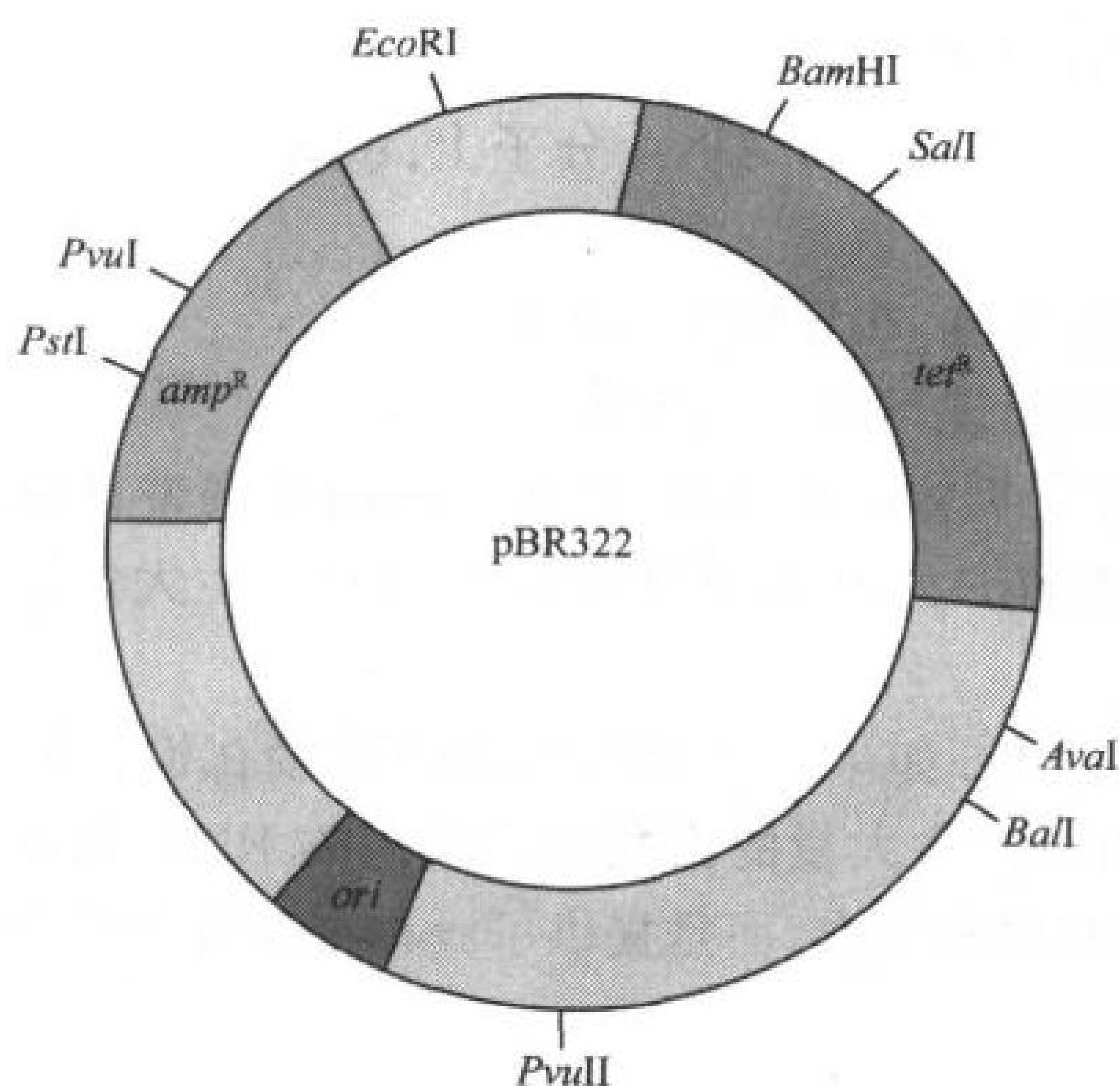


图 3-27 质粒 pBR322

图中所示为几个限制酶切位点，外源 DNA 可以很容易地插入这些位点处。amp^R 基因是抗氨苄青霉素的基因，tet^R 是抗四环素的基因，*ori* 是复制起始点。此质粒长 4362 bp，每条链都形成一个共价闭合环。

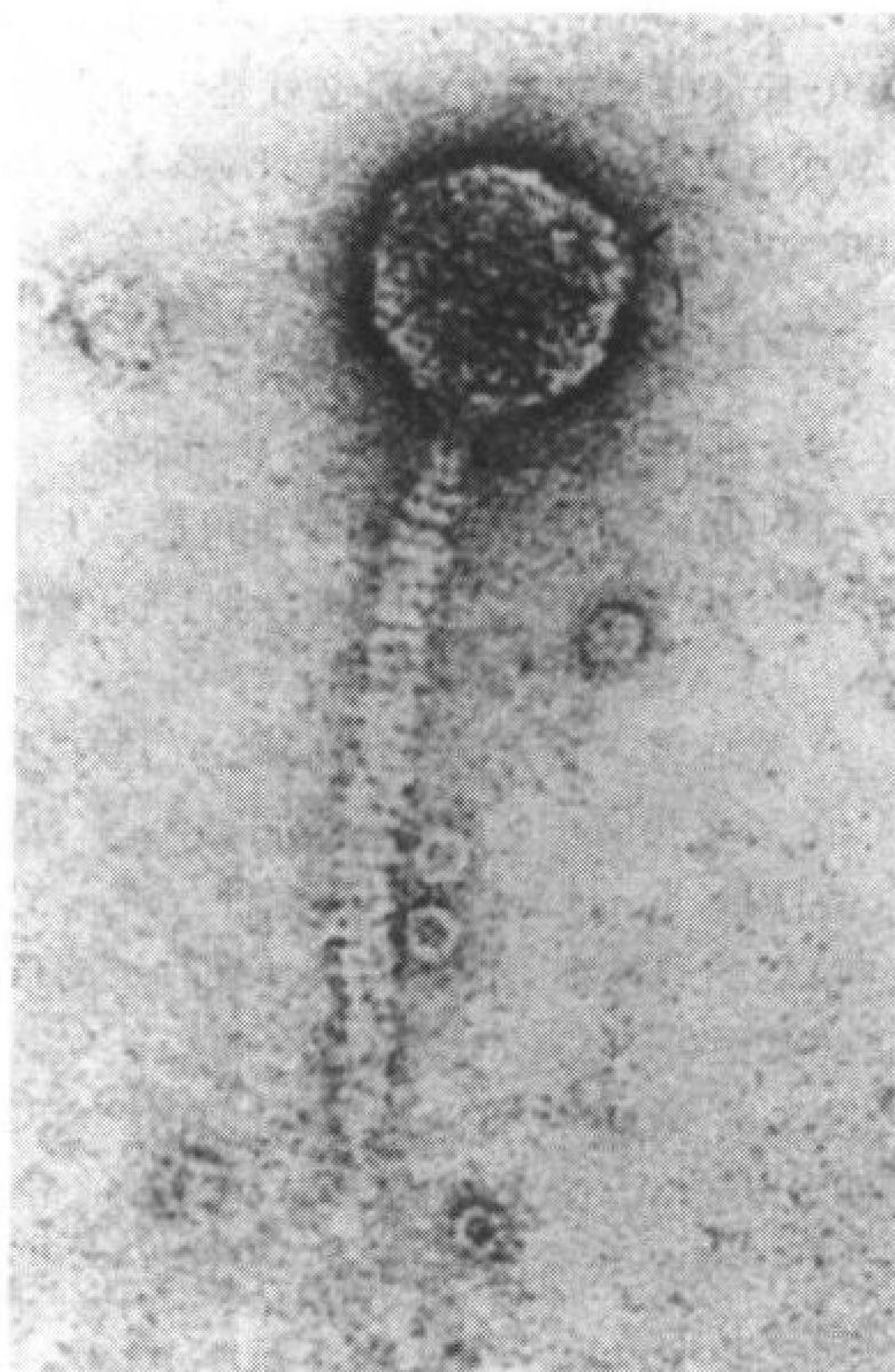


图 3-28 λ 噬菌体

在噬菌体侵染期，噬菌体"头部"包含的 DNA 进入到细菌细胞，在细胞内，DNA 大约复制 100 倍后包裹形成子代噬菌体。[A.F.Howatson 赠送的电镜照片，引自 Lewin, B., Gene Epression, Vol.3, Fig.5.23, Wiley(1977)]

连接

经常通过限制性内切核酸酶获取要克隆的 DNA 片段。大部分限制性内切核酸酶断裂双链 DNA 形成黏性末端(节 3-4A)。因此，正如 Janet Mertz 和 Ron Davis 在 1972 年首次证实的，一个

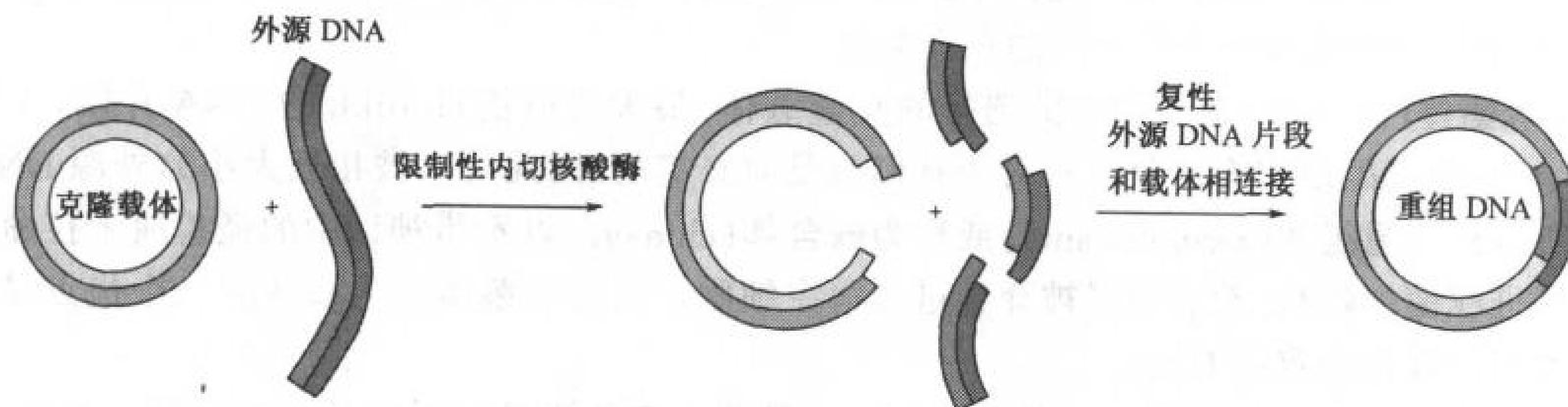


图 3-29 重组 DNA 分子的构建

克隆载体和外源 DNA 经同一种限制性内切核酸酶作用。载体和外源 DNA 片段的黏性末端复性，经过 DNA 连接酶作用后发生共价连接。结果形成了带有外源 DNA 片段的重组体。

限制性片段可以插入被相同限制酶切割的克隆载体中(图 3-29)。两条 DNA 的互补末端形成碱基对(**复性**, anneal)并且通过 **DNA 连接酶**(DNA ligase)的作用,使糖-磷酸骨架共价**连接**(ligate)或者拼接在一起(由噬菌体生产的连接酶可以连接平末端的限制片段)。用限制酶构建嵌合体的最大优点在于,插入的 DNA 可以用相同的限制酶从克隆载体上准确地切割下来。

转化和筛选

在 1973 年, Herbert Bayer 和 Stanley Cohen 首次在宿主细菌体内完成了嵌合质粒的表达。当宿主细菌与质粒混合时,细菌能吸收质粒,但是要让质粒在宿主体内稳定遗传则相当困难,转化的效率只能达到 0.1%。然而,单个转化细胞可以无限增殖,产生大量重组的 DNA。细菌铺在盛有半固体培养基的平皿上,密度要足够的低,因为只有这样,从单细胞长成的克隆才可以清楚地观察到并被分开。

只有那些被转化并且带有正确构建载体的宿主有机体,才是需要的,因此必须筛选。以质粒转化为例,可以通过抗生素来进行筛选。例如,由于 pBR322 质粒(图 3-27)的 *Bam*HI 位点插入了一段外源 DNA,使得被这种 pBR322 质粒转化的 *E. coli* 细胞只能抗氨苄青霉素而对四环素没有抗性,原因是外源片段的插入使得编码抗四环素的基因失活了。相反,当没有插入外源 DNA 的质粒 pBR322 进入细菌细胞之后,这个细菌既抗氨苄青霉素又抗四环素,而没有吸收质粒 pBR322 的细菌既无 amp^R(氨苄青霉素抗性)基因又无 tet^R(四环素抗性)基因,于是它对氨苄青霉素和四环素都很敏感。这样,正确转化的细菌可以生长在含有氨苄青霉素的培养基中,但不能生长在同时含有氨苄青霉素和四环素的培养基中。因此像 amp^R 和 tet^R 这样的基因被称为**选择性标记**(selectable marker)。

67

通过基因工程得到的不同的 λ 噬菌体带有不同的限制位点,并且这些位点之间连接着约为噬菌体基因组三分之一长的无用片段。这个片段可以被外源 DNA 所替换,但是只有当嵌合体 DNA 的长度为野生噬菌体长度 48.5kb 的 75%～105%时,才能被包裹在噬菌体颗粒内(图 3-30)。最终,没有带外源 DNA 的噬菌体载体不能繁殖,因为它们太短,不能形成侵染性的噬菌体

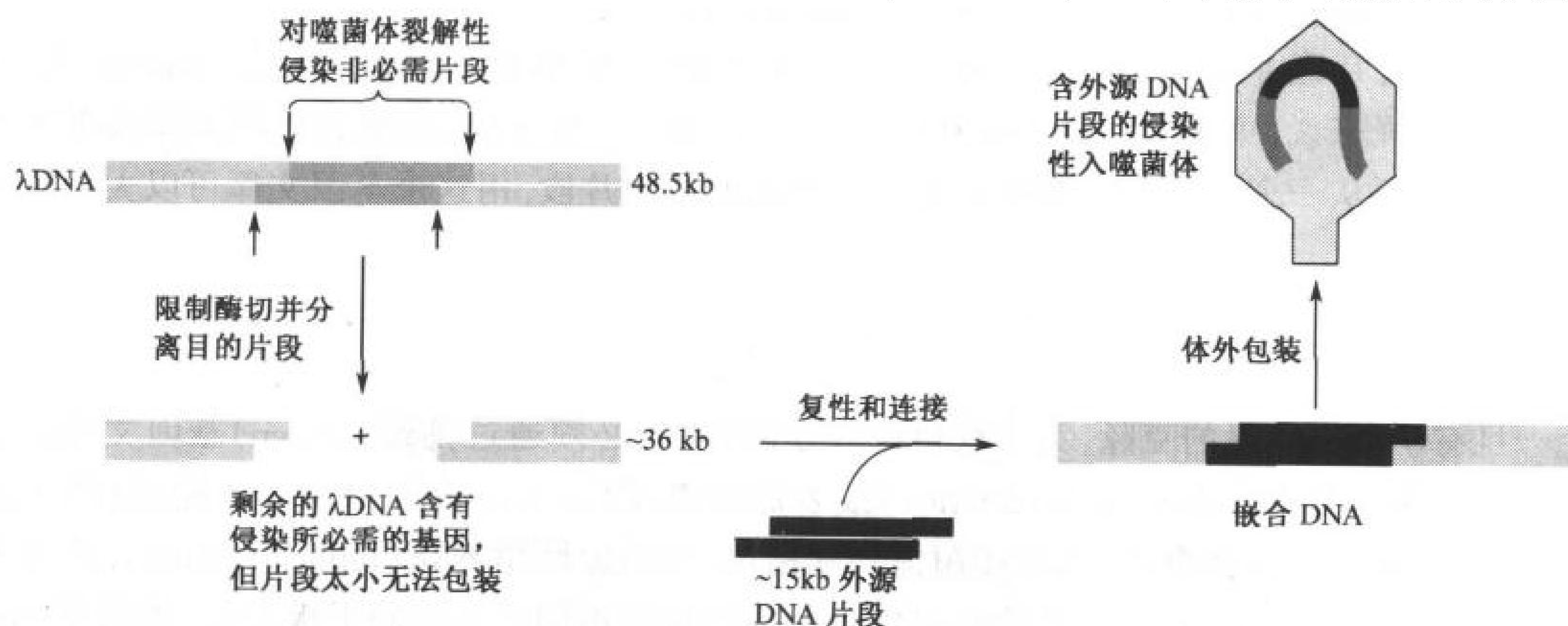


图 3-30　以 λ 噬菌体进行克隆

切除 λ 噬菌体基因片段中非必需部分,使得可以插入外源 DNA 片段。如果插入的 DNA 片段大小合适,则重组 DNA 可以被包裹形成侵染性噬菌体颗粒。

颗粒。当然,侵染性噬菌体颗粒的增殖并不产生生长的细菌克隆,而是在含有宿主细菌的培养板上形成**噬菌斑**(plaque,一个溶解的细菌细胞区域)。

B. 基因文库

如果要克隆某种特定的 DNA 片段,必须要先获得相对纯的这段 DNA。这个任务是很艰巨的。可以肯定这项工作是庞大的。想一想,人类 DNA 中,一个 1kb 大小的片段仅占人类基因组 2 900 000 000bp的 0.000 035%。当然,鉴定一个特定的基因,需要知道它的核酸序列或者它的蛋白产物。实际上,从有机体中鉴定一个特定基因并且克隆它,通常比克隆这种有机体的全长基因组后再鉴定包含有目的序列的克隆要困难得多。这样一套含有全部被克隆的片段被称为**基因文库**(genomic library)。

68

鸟枪法克隆

基因文库可以通过**鸟枪法克隆**(shotgun cloning)获得。分离生物有机体的染色体 DNA,切割成可被克隆大小的片段,然后插入载体中。DNA 通常只是部分地裂解成片段,而不是所有限制位点都被彻底切断,这样基因文库就包含生物体全部完整基因,这些基因包括有限制位点的片段。溶液中的 DNA 也可以通过快速机械搅拌来破碎[**剪切**(shear)]。

由于基因组相对于单个基因具有的数量很大,所以鸟枪法克隆必须服从概率定律。随机产生的需要克隆的片段的数目,必须保证目的序列在基因文库中至少出现一次的概率要十分的高。这个数量的计算方法如下:

$$P = 1 - (1 - f)^N \qquad [3\text{-}1]$$

因此

$$N = \lg(1 - P)/\lg(1 - f) \qquad [3\text{-}2]$$

P——一个特定基因至少出现一次的概率;

N——必须筛选的克隆数目,保证概率为 P;

f——一个分数,以克隆的片段平均大小除以基因组大小。

如果 $P = 0.99$,片段平均长度为 10kb,那么对于大肠杆菌来说,基因组全长 4600kb,则 $N = 2116$;对于果蝇来说,染色体全长 165 000kb,$N = 76\ 000$。用 YAC 构建的基因文库具有大的片段长度,因此要从一个大的基因组中获得一个给定的基因片段,用这个基因文库可以大大减少所需的工作量。

筛选

一旦有了所需数目的克隆,为了获得所需要的基因,必须通过**筛选**(screen)基因文库。这一步可以通过**集落杂交**(colony hybridization)或者**原位杂交**(*in situ* hybridization)完成(图 3-31)。克隆后的酵母菌落、细菌群落,或者噬菌体的噬菌斑,利用**影印培养法**(replica plating),从主平板转移到硝酸纤维素膜上(影印培养法也可以把菌落转移到不同培养基的平板上)。然后用 NaOH 处理纤维素膜,NaOH 可以裂解细胞或噬菌体,并把 DNA 分离成单链 DNA 分子,单链 DNA 分子更易吸附在膜上。烘干膜,固定 DNA,再和标记**探针**(probe)一起孵育。这些探针是短的 DNA 或 RNA 片段,它们的序列与目的基因部分互补。洗掉未结合的探针,依据探针标记,利用适当的技术检测仍留在膜上的探针[例如,放射性标记的探针使 X 线片曝光,即**放射自显影**(autora-

69

diography);或者荧光标记的探针显示不同波长的]。只有那些含有目的基因的菌落或者噬菌斑能够和探针结合,因此可以被检测出来。在主平板上就可以获取相应的群落。使用这种技术,就可以容易地从包含有大约一百万个克隆的人类基因组文库中筛选出特定的DNA片段。

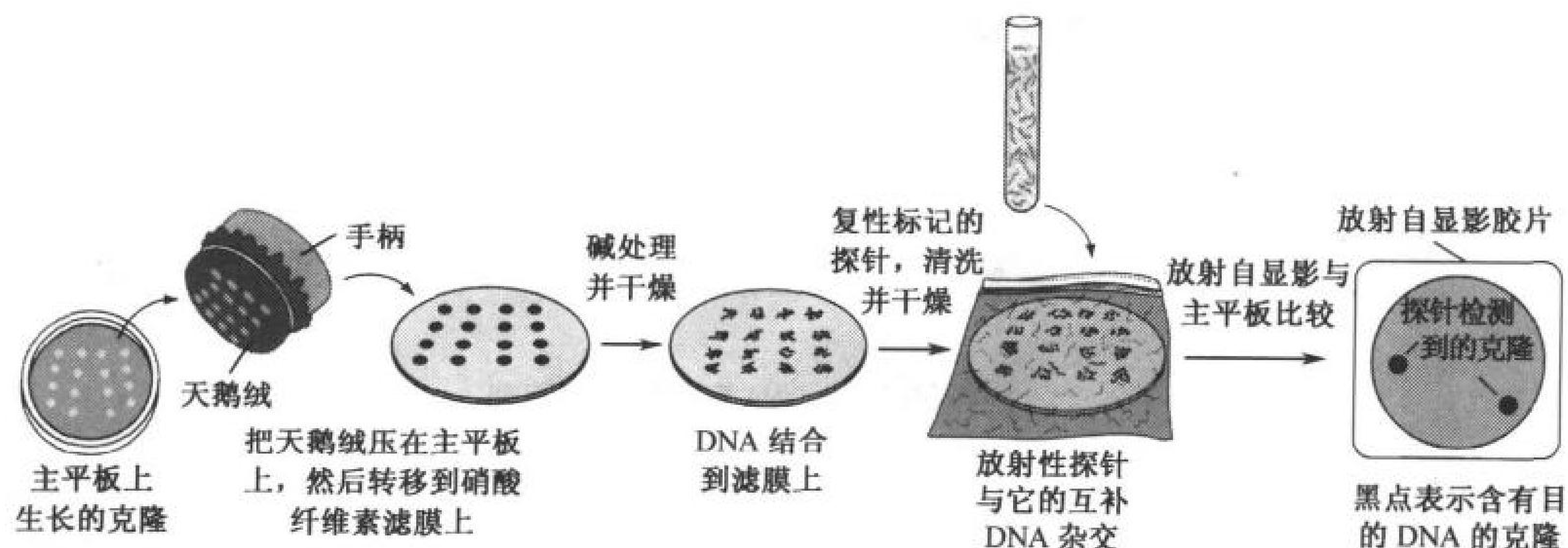


图3-31　原位杂交技术

菌落从主平板的培养基上通过影印培养转移。带有目的基因的菌落通过结合特定探针而被鉴定出来。这里,通过放置X线片在纤维膜上,检测DNA和探针的结合。由于主平板上的菌落和纤维膜上的位置一致,所以容易得到阳性克隆。

选择一个可以鉴定未知序列基因的探针,是需要一定技巧的。相应的mRNA可以用来作为探针,如果能得到足够分离的量的话。另外,如果这个基因编码的蛋白质的氨基酸序列已知的话,探针可以是不同的寡聚核苷酸的混合物,这些寡聚核苷酸与推测出的基因序列部分互补。

C. 用聚合酶链反应进行DNA扩增

分子克隆技术对于现代生物化学的研究是必不可少的,**聚合酶链反应**(PCR)对于特定DNA的扩增,是一种更为快速和便利的方法。Kary Mullis在1985年发明的这项技术,可以扩增长达6 kb的片段。在PCR过程中,已经分解成单链的DNA样品和DNA聚合酶、dNTP以及两种引物(分别与目的DNA的两侧相互补)一起孵育。这些引物可以指导DNA聚合酶合成目的基因的互补链(图3-32)。此过程经多次循环后可以获得大量目的基因,DNA以几何级数扩增,即使从单拷贝开始。每次循环,DNA双链都需经过热变性分离,通过复性,引物与它们的互补DNA片段结合,并且DNA聚合酶指导DNA互补链合成。热稳定性DNA聚合酶的使用,即 ***Taq* 聚合酶**[来自一种生存在75℃的水生耐热菌(*Thermus aquaticus*)中],使得在每次热变性之后,不需要再加入新鲜的聚合酶(高温会使大多数酶失活)。因此,在足够量的引物和dNTP存在的前提下,PCR反应能在循环的变温下进行。

20个PCR循环之后,目的序列可以扩增约百万倍(~2^{20}),并且具有高纯度。的确,只要有10^5个细胞的样品,PCR就可以扩增目的DNA。所以不用前面谈及过的DNA纯化(见框3-2),这种方法就可以进行。扩增得到的DNA可以用来测序或是克隆。

D. DNA重组技术的应用

分子克隆技术除了应用于实验室,还被进一步发展和完善,使其应用于医学和商业目的。在体外进行基因操作,可以改变基因,产生功能增强的蛋白质,或者用于修复基因缺陷。

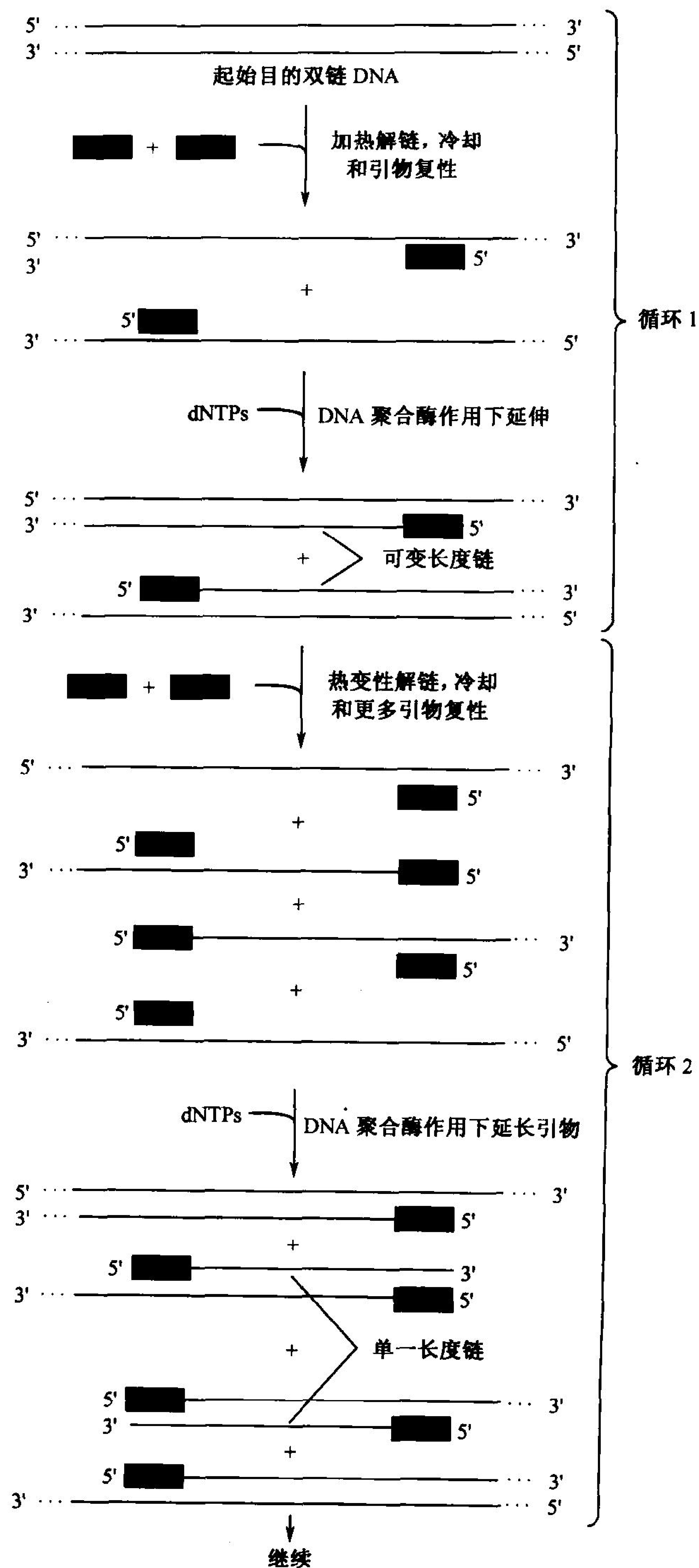


图 3-32　PCR 反应

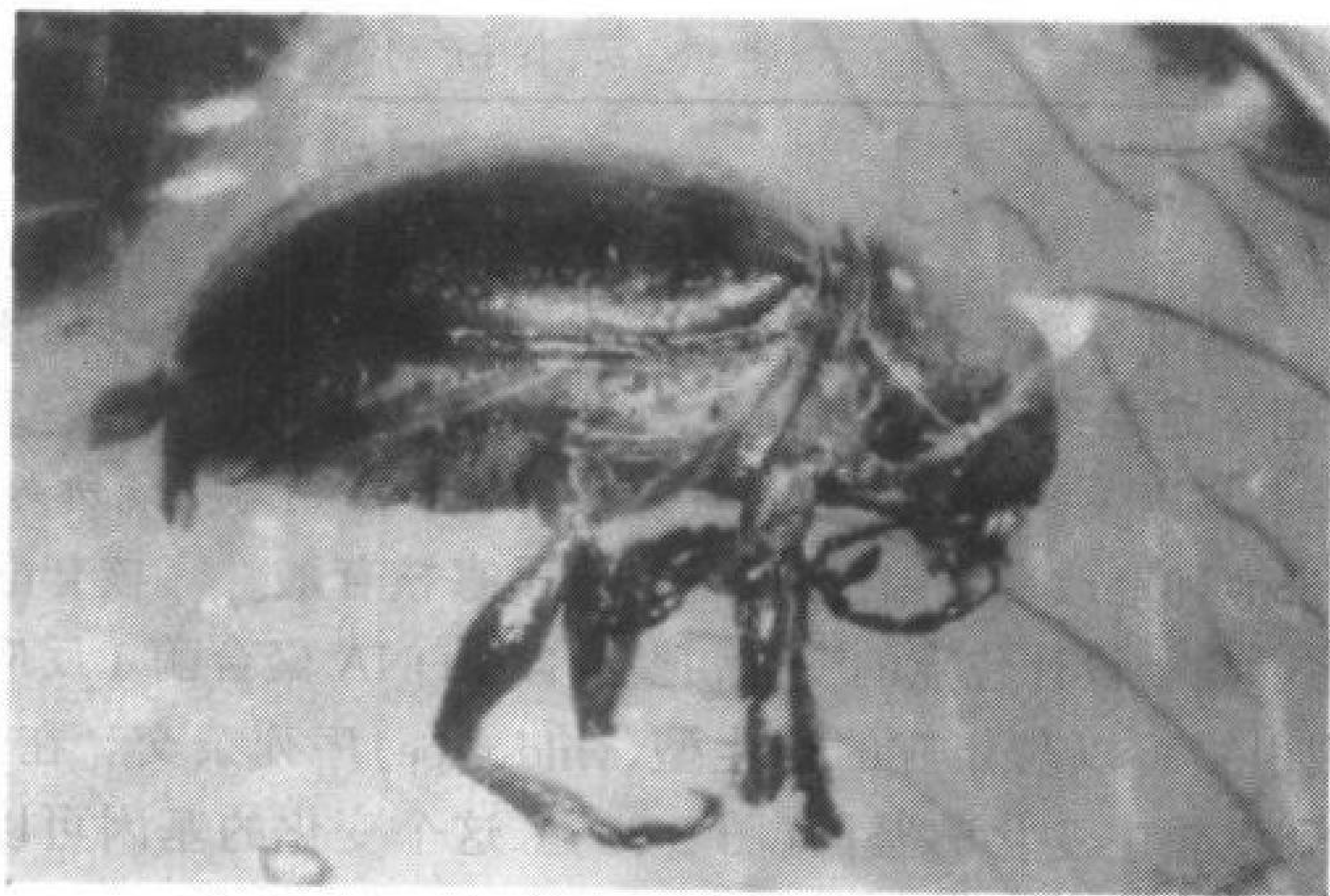
在每一次循环反应中，DNA 双链都经过热变性，反应混合物降温复性使引物可以与每条链的互补序列结合，再在 DNA 聚合酶作用下延长引物链。每次循环产生的单链，都扩增一倍。通过选择和目的基因两端互补的引物，使目的基因扩增数以百万倍。

框 3-2　生物化学焦点

PCR 的用途

PCR 扩增已经成为必不可少的工具。临床上，它被用来诊断传染性疾病和探测罕见的病变，例如导致癌症的突变。法庭上，从单根毛发或精液中取得的 DNA，经过 PCR 扩增，然后利用限制性片段多态性来鉴定来源。传统的 ABO 血型分析需要硬币大小的一滴血；而 PCR 只需要针尖大小的生物液体样品，就已足够有效。大多数的法庭现在认为，DNA 序列可以明显鉴定一个个体，如同指纹一样，因为两个个体大范围的 DNA 序列相同的机会只有百万分之一甚至更小。在少数情况下，PCR 令人惊讶的给予了一些犯人以公正，这些犯人基于 PCR 证明无罪，结果从监狱中释放出来，即使是在已搜集到"犯罪证据"很多年后。

PCR 在很大程度上使新的学科——分子古生物学（古生物学是根据远古生命的化石遗迹研究它们的形态）出现了。例如，已经从 12 亿到 13.5 亿年前琥珀包裹的昆虫中提取出了 DNA。DNA 通过 PCR 扩增后进行测序。无论是琥珀中的小虫，还是化石中的树叶，或者是冰冻的猛犸象，从中得到的 DNA 片段都可用于 PCR 技术。比较 DNA 序列可以得到古生物和现代物种间的进化关系。琥珀是理想的保存 DNA 的介质，因为它防止了水分进入，而若干年后水会使 DNA 降解。没有很好保存的标本中所包含的 DNA，很容易被降解掉而不能用于 PCR。当然，PCR 强大的扩增能力也要求特别的小心，以免在操作时发生污染。现在的 DNA，尤其是 PCR 操作人员的 DNA，最容易带来污染。事实上，许多报道来自化石中的 DNA 在事后都已被证实是来源于现代生物。



（引自© John D. Cunningham/Visuals Unlimited）

种群遗传学家正在利用 PCR 法探测大范围内物种、种群之间的关系，包括人类。PCR 也被用于探索某些古代人群（他们的头埋在已成泥碳的沼泽中，由于缺氧而没被降解，或者在某些地区，这些尸体长久的被冰冻）的起源。即使是外形和语言信息对研究已很有用，由 PCR 所得到的 DNA 序列仍然对探索人类的行为提供了大量有价值的数据。

蛋白质的生产

大量稀有的或新的蛋白质的生产，是直接以细菌自身的蛋白质产生的。一个克隆基因必须插入到**表达载体**（expression vector）上，表达载体是包含正确转录和翻译控制序列的质粒。目的蛋白的表达可以占到宿主细胞内全部蛋白总量的 30%。这种经基因工程改造的生物体被称为**超量生产者**（overproducer）。细菌经常隐匿大量的无用甚至可能是毒性（对细菌而言）的不溶性

内含蛋白，它们比起可溶性蛋白或分泌蛋白来讲，要求更为精细的纯化方法。

只有当含有编码蛋白的重组 DNA 带有细菌的转录、翻译控制序列时，细菌才可以产生真核生物的蛋白。真核生物的蛋白在细菌体内表达也存在一些问题。例如，许多真核生物的基因很大并且有**内含子**(intron)，可以发生转录，但在翻译前要准确切除(节 25-3A)；细菌缺乏切除内含子的机制。另外，许多真核生物的蛋白会在翻译后，通过添加糖基或其他反应进行修饰。这些问题可通过使用在真核宿主中繁殖的表达载体来克服，宿主可以是酵母、培养的昆虫或动物细胞。

72

表 3-5 中列举了一些运用于医学和农学的重组蛋白质产物。在许多方面，直接从人体或动物体中纯化这些蛋白，从伦理和事实两个角度上都是不太可能的。表达系统允许大规模、有效地制备这些蛋白，同时又减小了在组织样品中存在的病毒或其他病原体可能带来的污染。

表 3-5　基因工程中所获得的部分蛋白质产物

蛋　　白	用　　途
人胰岛素	治疗糖尿病
人生长激素	治疗内分泌紊乱
促红细胞生成素	刺激红细胞生成
集落刺激因子	产生大量白细胞
凝血因子 IX 和 X	治疗血友病
组织型血纤维蛋白溶酶	血凝块的溶解
牛生长素	促牛产奶

定点突变

分离得到某基因后，通过修改核苷酸序列从而改变其编码蛋白的氨基酸序列，这是可能的。Michael Smith 首先使用了**定点突变技术**(site-directed mutagenesis)，在实验室中模拟自然进化过程，并且通过严格测定来推测某种蛋白中特定氨基酸对蛋白结构与功能所起的作用。

要通过定点突变来准确地改变基因，必须合成一段寡核苷酸。寡核苷酸的序列与目的基因的大部分是一致的，除了几个设计位点的变化，把它作为 DNA 聚合酶 I 反应的引物。如果只有很少错配碱基存在，则引物可以与相应的**野生型**(wild-type)序列杂交。在 DNA 聚合酶 I 作用下，引物延伸，并且得到设想中变化的基因(图 3-33)。这个变化的基因可以插入适当载体。也可以通过 PCR 的方法，用引物合成变化的基因。

转基因生物

为了许多目的，修改一个完整的生物体会比仅仅生产一种蛋白更可取——这就是真正的基因工程。表达来自其他生物基因的多细胞生物体被称为**转基因**(transgenic)**生物**，而被移植的外源基因被称为**转移基因**(transgene)。

为了使改变更为持久，也就是说可以遗传，一个转移基因必须被稳定地整合到生物体的生殖细胞中。对小鼠来说，使用微注射方法将克隆的目的基因(带有希望改变的位点)注入到受精卵，然后移植到母体的子宫中。著名的转基因鼠的实验，就是让老鼠携带了额外的生长激素基因拷贝(图 3-34)。

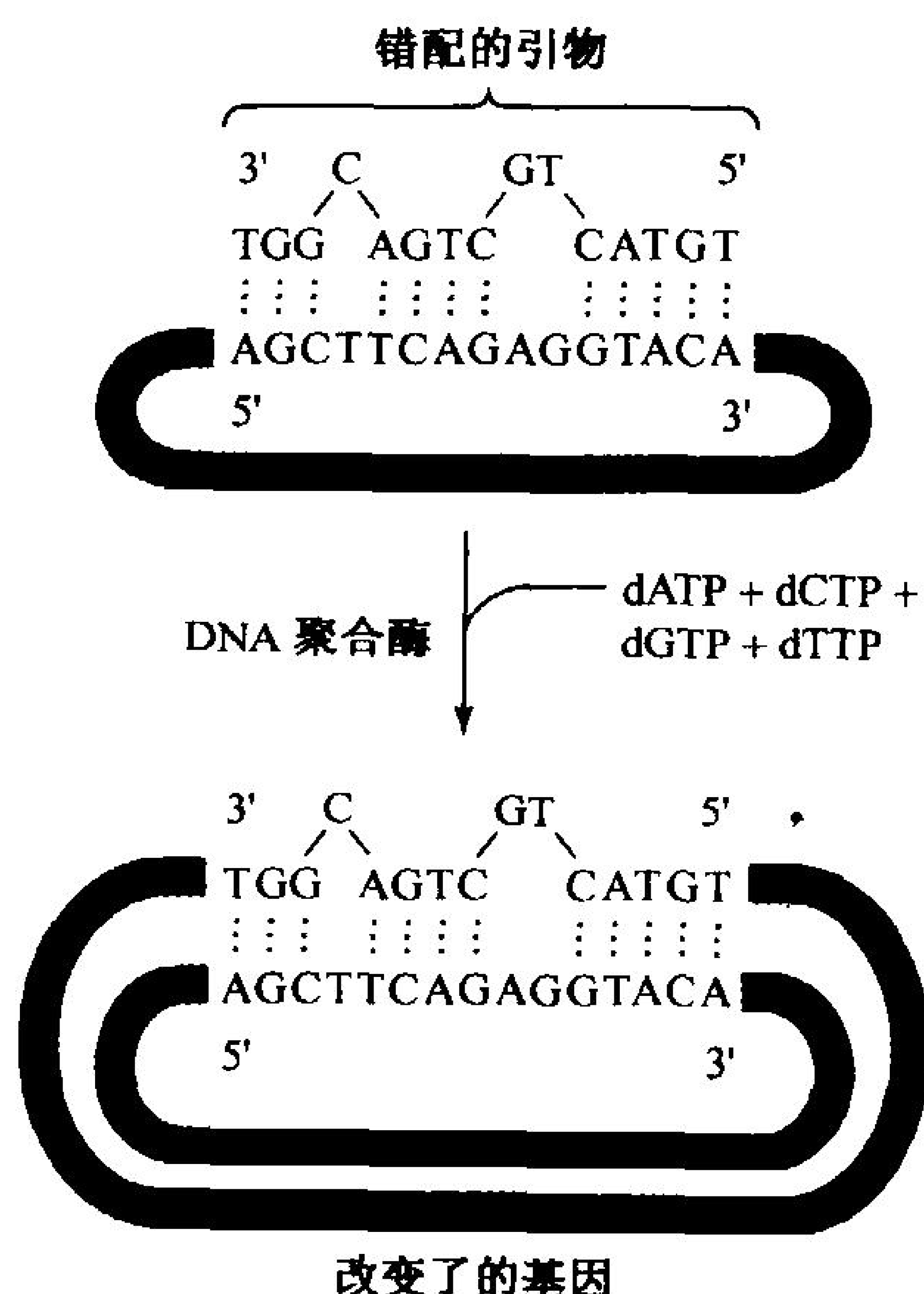


图 3-33　定点突变

带有目的碱基的化学合成的寡核苷酸退火后，和想要改变的基因的互补链配对(绿色链)。错配的引物在 DNA 聚合酶的作用下延伸形成突变基因(蓝色链)。突变基因能被插到合适的载体，然后被扩增、表达或产生突变生物体。



图 3-34　转基因鼠

左边的那只比较大。它是利用微注射法将鼠的生长激素基因注射到受精卵后培养成的。它的重量几乎是右边那只正常小鼠的两倍。

转基因牲畜已经诞生。理想的情况是，将这些动物的基因进行改造，使动物吃少量的食物而快速生长，或者使动物可以抵抗特殊的疾病。某些转基因动物可以在它们的乳汁中分泌大量药用蛋白，从乳汁中提取这种物质比从培养的细菌中提取相同的物质更加经济。转基因植物也已经培育成功，包括抗冻的草莓、晚熟的西红柿、抗虫害的谷物。

73

转基因生物使我们对基因表达的理解更进了一步。一些动物经过基因工程的处理，使其带有缺陷基因或是整个基因缺失[也称为**基因敲除**(gene knockout)]，能被用来作为治疗人类疾病的实验模型。

基因治疗

基因治疗(gene therapy)是将新的遗传物质转入个体细胞，以产生治疗效果。尽管这项基本技术潜在的利益很多，仍然有大量实际上的障碍需要克服。最早的基因治疗实验从 1990 年开始，是 W.French Anderson 和 Michael Blaese 将**腺苷脱氨酶(ADA)**的基因导入几名儿童体内。遗传性缺乏 ADA 的个体患有**严重联合免疫缺陷症(SCID**；见框 22-2)，这样的个体必须要隔离以避免可能产生致命的感染。基因治疗所涉及的伦理问题(见框 3-3)，使得放弃成功的传统治疗手段而选择实验治疗变得很困难。在具有 SCID 症状的儿童的案例中，继续给予他们外源性的重组 ADA，但很难控制剂量。尽管如此，仍有 4000 多种遗传性疾病正有待于基因治疗，尤其是那些没有其他替代疗法的疾病。

框 3-3 生物化学相关内容

重组 DNA 技术的伦理道德问题

在 20 世纪 70 年代早期，首次讨论基因工程时，几乎对实验过程的安全性毫无所知。在很多争论之后，此类实验被延期。在此期间，重组 DNA 研究的规章开始起草。法规禁止进行明显具有危险性的实验（例如，将白喉病毒转入 *E. coli*，这也许会将人的共生菌转化为某种致命病原菌）。另外，要防止有害生物进入环境。例如，许多载体在宿主体内被克隆时，必须要求有特定的营养基，以便使得这些生物体在实验室外的环境中无法生存。

重组 DNA 技术已展示的价值几乎使它早期的反对者都默不作声。当然，如果不用克隆技术，那么有些病原菌的研究就无法展开，例如，引起 AIDS 的病毒。虽然没有出现因为重组导致的遗传性灾难，但这并不说明重组生物对环境不会造成不利的影响。不过，基因工程学家用这个技术模拟自然进化，也就是变异和选择，因此自然和人创造的生物体应该基本上是相似的。无论如何，人类已经有几千年培育植物和动物的历史，今天的 DNA 重组实验，人们大多也是为了同样的目的。

当新的基因工程技术成为可能时，将会面对一些其他的伦理问题。培养细菌而获得的人类生长激素现在已经限制性地用于增加不正常的较低儿童的身高。然而，为了使他们长得更高更壮，像有些报道的那样，应该允许运动员使用这种蛋白吗？几乎没有人对基因治疗持有异议，如果它能更好发展的话，像治愈类似镰状细胞贫血（节 7-2D）和 Lesch-Nyhan 综合征（节 22-1D）等遗传性基因缺陷病。然而，如果基因治疗使得改变复杂特性（多基因决定）成为可能，例如运动能力和智力，那么什么样的改变是在考虑之中，而且由谁来决定这些问题呢？到底基因治疗是只能用来修复个体缺陷，还是使其改变生殖细胞的基因，以获得不会发生遗传缺陷的下一代呢？如果确定个人的遗传图谱成为很容易的事情，那么这些信息是否允许被用来评价准备受教育的人、申请工作者和应用于医疗保险中呢？

当新基因被发现和测序完成后，遗传信息可能的商业价值就随之增加。核酸序列可以申请专利吗？到达一个什么样的程度，个人所有权才可以阻止理念和信息的自由交换？而这些理念和信息，正是迄今为止科学知识所追求的。

74

小 结

1. 核苷酸是由嘌呤或嘧啶碱基和带有至少一个磷酸的核糖相连接构成的。RNA 是由核糖核苷酸构成。DNA 是由脱氧核糖核苷酸（有一个 2′-脱氧核糖）构成。
2. 核苷酸（如 ATP）和核苷酸衍生物（如：FAD、NAD^+ 和 CoA）在能量代谢中起决定性的作用。
3. DNA 是由两条反向平行的核苷酸链构成的，两条链通过磷酸二酯键连接，形成双螺旋结构。碱基互补配对：A 和 T，G 和 C。
4. 单链核酸（如 RNA）可以形成茎-环结构。
5. DNA 的核苷酸序列带有遗传信息。DNA 复制时，DNA 的每条链都以自身为模板合成另一条互补链。
6. 根据分子生物学的中心法则，DNA 的一条链可以转录成 mRNA。通过与 tRNA 分子相连的氨基酸有序的添加，mRNA 又可以翻译成蛋白质。在核糖体中，tRNA 和 mRNA 的碱基互补配对。
7. 识别 DNA 某段序列的限制性内切核酸酶可以用来专一性断裂 DNA 分子。
8. 凝胶电泳可以用来分离和测定 DNA 片段大小。
9. 链终止法测定 DNA 序列时，利用 DNA 的一条链的核苷酸序列，通过酶促反应合成互补的多聚核苷酸链，用 4 种核苷酸的双脱氧类似物分别中止相关键的聚合反应。再使用电泳来分离这些大小不等的多聚核苷酸片段，然后重新构建原有的序列。

10. 变异和其他 DNA 的改变是生物体进化的基础。
11. 进行分子克隆时，外源 DNA 被插入到载体上，可以在宿主细胞内扩增外源 DNA。转化的细胞能通过选择性标记来鉴别。
12. 基因文库包括某一生物所有的 DNA。可以通过筛选技术鉴定含有特殊 DNA 片段的克隆体。
13. 聚合酶链反应可以扩增目的基因。
14. 用重组 DNA 的方法可以从细胞中或生物体中获得野生的或者选择突变的蛋白质。

参考文献

总论

Hartl, D.L., *Essential Genetics,* Jones and Bartlett (1996). [Includes chapters on DNA structure and function and recombinant DNA.]

McCarty, M., *The Transforming Principle,* Norton (1985). [A chronicle of the discovery that genes are DNA.]

核酸的结构和功能

Gesteland, R.F. and Atkins, J.F. (Eds.), *The RNA World,* Cold Spring Harbor Laboratory Press (1993). [A collection of papers; Chapters 1, 2, and 4 provide an overview of the importance of RNA in the prebiotic world.]

Neidle, S., *DNA Structure and Recognition,* IRL Press (1994).

Watson, J.D. and Crick, F.H.C., Molecular structure of nucleic acids, *Nature* **171,** 737–738 (1953); *and* Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid, *Nature* **171,** 964–967 (1953). [The seminal papers that are widely held to mark the origin of modern molecular biology.]

Pääbo, S., Ancient DNA, *Sci. Am.* **269**(5), 86–92 (1993).

Rosenberg, J.M., Structure and function of restriction endonucleases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1,** 104–113 (1991).

Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T., *Molecular Cloning* (2nd ed.), Cold Spring Harbor Laboratory (1989). [A three-volume "bible" of laboratory protocols with accompanying background explanations.]

DNA 测序

Lander, E.S., The new genomics: Global views of biology, *Science* **274,** 536–539 (1996). [Lists some specific aims of genome sequencing efforts.]

Lipschutz, R.J. and Fodor, S.P.A., Advanced DNA sequencing technologies, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4,** 376–380 (1994).

Sanger, F., Sequences, sequences, sequences, *Annu. Rev. Biochem.* **57,** 1–28 (1988). [A scientific memoir.]

重组 DNA

Erlich, H.A. and Arnheim, N., Genetic analysis using the polymerase chain reaction, *Annu. Rev. Genet.* **26,** 479–506 (1992).

Fersht, A. and Winter, G., Protein engineering, *Trends Biochem. Sci.* **17,** 292–294 (1992).

Glover, D.M. and Hames, B.D. (Eds.), *DNA Cloning: A Practical Approach* (2nd ed.), Vols. 1 and 2, IRL Press (1995).

Mullis, K.B., The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am.* **262**(4), 56–65 (1990).

Watson, J.D., Gilman, M., Witkowski, J., and Zoller, M., *Recombinant DNA* (2nd ed.), Freeman (1992). [A detailed exposition of the methods, findings, and results of recombinant DNA technology and research.]

关　键　词

核酸　nucleic acid
碱基互补配对　complementary base pairing
外切核酸酶　exonuclease
原位杂交　in situ hybridization
噬菌斑　plaque
核苷酸　nucleotide
基因组　genome
回文序列　palindrome
基因文库　genomic library
核苷　nucleoside
染色体　chromosome
黏性末端　sticky end
鸟枪法克隆　shotgun cloning
核糖核酸　RNA
二倍体　diploid
平末端　blunt end
集落杂交　colony (*in situ*) hybridization
DNA
单倍体　haploid
凝胶电泳　gel electrophoresis
复制铺板　replica plating
辅酶 A　CoA
碱基对　bp
限制酶图谱　restriction map
放射自显影　autoradiography
多聚核苷酸　polynucleotide

75

千碱基对 kb
脱氧核苷三磷酸 dNTP
聚合酶链反应 PCR
磷酸二酯键 phosphodiester bond
茎-环 stem-and-loop
引物 primer
表达载体 expression vector
核苷酸残基 nucleotide residue
基因 gene
双脱氧核苷三磷酸 ddNTP
超量生产者 overproducer
5′末端 5′ end
转化 transformation
点突变 point mutation
定点突变 site-directed mutagenesis
3′末端 3′ end
复制 replication
重组 recombination
野生型 wild type
单体 monomer
转录 transcription
转座 transposition
转基因生物 transgenic organism
二聚体 dimer
三聚体 trimer
翻译 translation
信使 RNA mRNA
表现型 phenotype
转基因 transgene
基因敲除 gene knockout
核糖体 RNA rRNA
克隆 clone
基因治疗 gene therapy
四聚体 tetramer
寡聚体 oligomer
转运 RNA tRNA
载体 vector
Chargaff 法则 Chargaff's rule
核糖体 ribosome
质粒 plasmid
互变异构体 tautomer
基因表达 gene expression
噬菌体 bacteriophage
重组体 recombinant
双螺旋结构 double helix
修饰性甲基化酶 modification methylase
酵母人工染色体 YAC
反向平行 antiparallel
内切核酸酶 endonuclease
复性 anneal
大沟 major groove
限制性内切核酸酶 restriction endonuclease
连接作用 ligation
小沟 minor groove
选择性标记 selectable marker

学习思考题

1. 写出 A、G、C、U 和 T 的结构。
2. 画出核苷酸和脱氧核苷酸的简单结构图。
3. 比较 DNA 和 RNA 之间化学和生物学性质的异同。
4. 简述分子生物学的中心法则。
5. 描述 Watson-Crick 的 DNA 模型。
6. 限制修饰系统是如何进行操作的?
7. 试述 DNA 测序的链末端终止法。

练 习 题

1. 三磷酸核苷可以在激酶作用下转移一个磷酸。下面哪个酶促反应是正确的?

(a) ATP + GDP ⟶ ADP + GTP

(b) ATP + GMP ⟶ AMP + GTP

(c) ADP + CMP ⟶ AMP + CDP

(d) AMP + ATP ⟶ 2 ADP

2. 一个二倍体生物,基因组有45 000kb,其中包括21%G碱基。请计算此生物体每个细胞中DNA上的A、C、G和T的数量。

3. 画出腺嘌呤(A)和胞嘧啶(C)的互变异构体。

4. 在下列各条件下4种不同的核苷酸理论上可以编码多少种氨基酸。

(a) 每个核苷酸编码一种氨基酸;

(b) 2个有序核苷酸编码一种氨基酸;

(c) 3个有序核苷酸编码一种氨基酸;

(d) 4个有序核苷酸编码一种氨基酸。

5. 利用表3-3中的数据,鉴定表中的限制酶,哪些能

(a) 产生平末端;(b) 识别并切割相同序列(称为同裂酶 isoschizomers);(c) 产生黏性末端。

6. 对于一个环状质粒,从下列数据中构建一个限制酶图谱。

限制酶	片段大小/kb
*Eco*RI	4.0
*Hae*II	1.6, 2.4
*Pst*I	1.9, 2.1
*Eco*RI 和 *Hae*II	0.7, 1.6, 1.7
*Eco*RI 和 *Pst*I	0.8, 1.3, 1.9
*Hae*II 和 *Pst*I	0.6, 0.9, 1.0, 1.5

7. 请描述下列条件下链终止法测序的结果。

(a) 几乎不加 ddNTP;

(b) 加大量 ddNTP;

(c) 几乎没有引物;

(d) 加大量引物。

8. 克隆 *C.elegans*(表3-4)的长约5kb的片段,克隆系数为0.99。请计算所需克隆的数目。

9. 如果外源DNA被插入pBR322的*Pst*I位点而后又转入*E.coli*细胞中。请问如何筛选重组体。

10. 描述下列条件可能产生的PCR结果:

(a) 不小心反应混合物中遗漏了引物中的一个。

(b) 一个引物能与初始DNA的多个位点相互补。

(c) 在初始样品中仅有一个拷贝,目的基因序列有一条单链被断裂。

(d) 在初始样品中仅有一个拷贝,目的基因序列的双链被断裂。

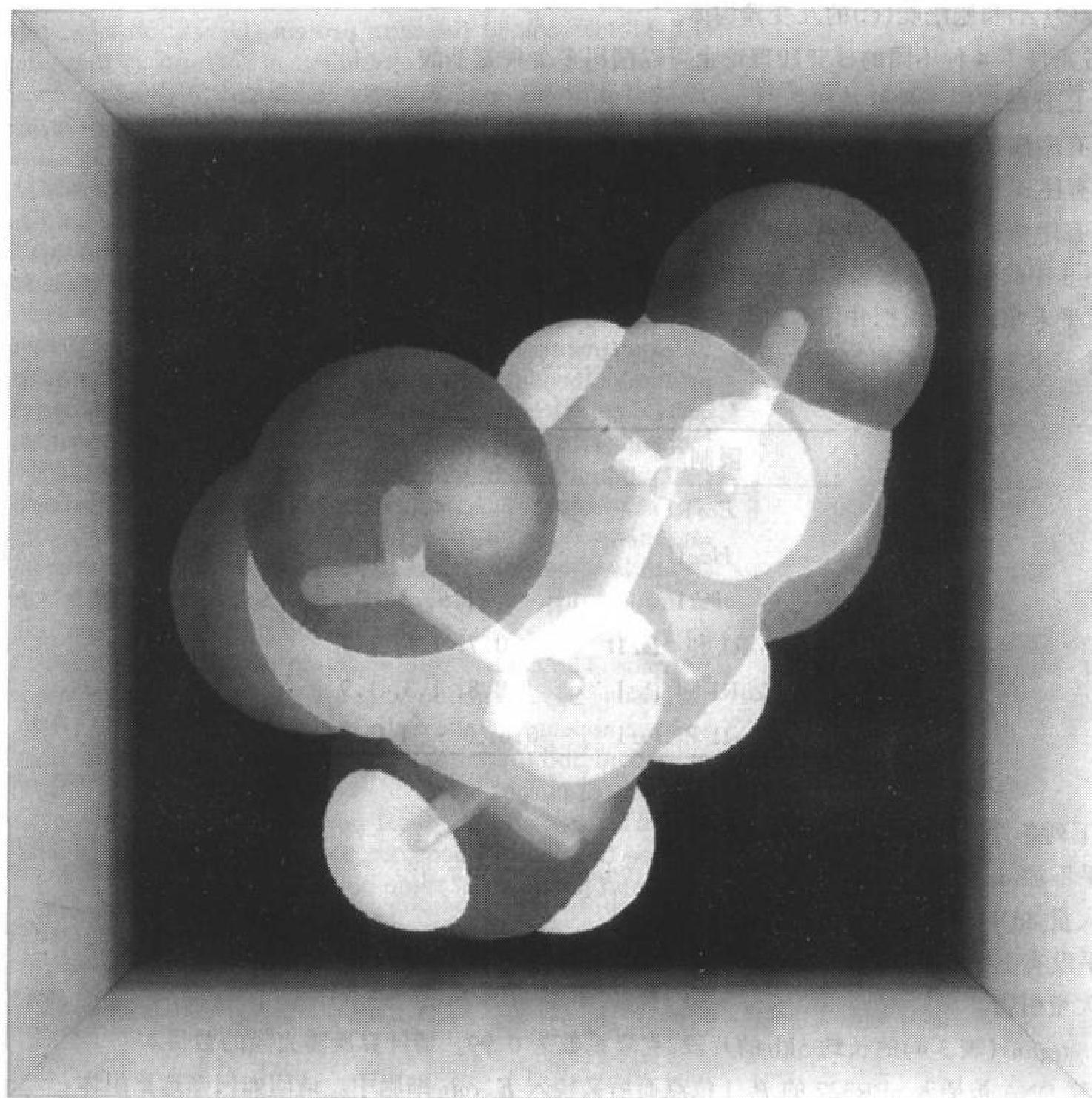
11. 通过PCR可以扩增如下DNA片段,写出其两个12个残基引物的序列。

ATAGGCATAGGCCCATATGGCATAAGGCTT-
TATAATATGCGATAGGCGCTGGTCAG

(问题的提供者:Bruce Wightman, Muhlenberg College.)

(清华大学 段明星 译 郑昌学 校)

第4章　氨　基　酸



每个氨基酸是由功能基因决定其独特性质的小分子。例如，谷氨酸有一个氨基和两个羧基，在中性 pH 下这些基因都电离成离子。此图显示了一个半透明空间填充的相应棒式模型。

78

早在 19 世纪,科学家开始把注意力转向营养,他们很快发现含氮天然产物对动物的生存是必需的。1839 年荷兰化学家 G.J.Mulder 杜撰了**蛋白质**(protein)(希腊语:proteios, 意为原始的)来表示这类化合物。尽管 1830 年已经分离出了第一个氨基酸,那时的生理化学家并没有意识到蛋白质实际上是由较小的氨基酸所组成。事实上,多年来,人们一直认为来源于植物的物质,包括蛋白质,是整体被掺入到动物组织中的,这种误解在消化过程被阐明时才得以休止。在明确食入的蛋白质被分解成包含氨基酸在内的较小化合物之后,科学家才将注意力转向这些化合物的营养性质。

动物喂养实验表明蛋白质的氨基酸含量决定其营养是否充分。例如,某些谷类蛋白质缺乏赖氨酸,动物饮食缺少赖氨酸,动物就不能茁壮成长。直至 1925 年 20 种基本的氨基酸结构才被测定,蛋白质中不同氨基酸的相对营养重要性才有详尽的文献记载。蛋白质和氨基酸的近代研究大部分是 19 世纪的实验。现在,我们知道含氮的氨基酸对生存是必需的,它们是蛋白质的构建材料。氨基酸在生物化学中的中心作用或许并不会使人惊奇:有些氨基酸是地球史早期就出现的有机化合物(节 1-1A)。氨基酸作为古老而普遍存在的分子,为了生命体系中的各种目的而被进化选择。本章以讨论常见氨基酸的结构和化学性质,包括它们的立体化学开始,以某些独特氨基酸的结构和功能的简洁概括而结束。

1. 氨基酸结构

对几乎可想到来源的大量的蛋白质进行分析,表明*所有的蛋白质都是由 20 种基本氨基酸所组成*,并不是每一种蛋白质都含这 20 种氨基酸,但几乎每种蛋白质都包含这 20 种氨基酸的绝大多数。

普通的氨基酸被称为 **α-氨基酸**,因为它们有一个伯氨基($-NH_2$)和一个羧基($-COOH$),作为在同一碳原子(**α 碳**:图 4-1)上的取代物。脯氨酸是惟一的例外,它有一个二级氨基($-NH-$),虽然和普通的氨基酸不一样,我们还是将它归入 α-氨基酸。20 种基本氨基酸的结构不同在于它们的侧链(**R 基团**)。

表 4-1 展现了 20 种基本氨基酸的名称和完整的化学结构。

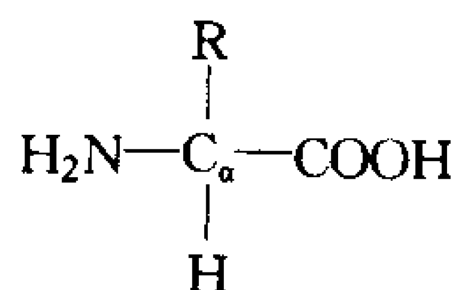


图 4-1　α-氨基酸的一般结构
R 基团的不同可区分为 20 种基本氨基酸。

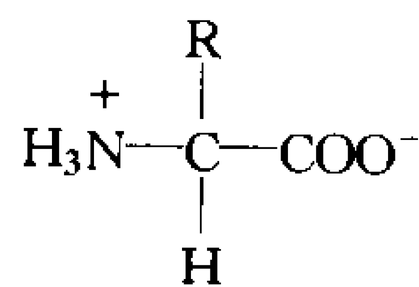


图 4-2　兼性氨基酸
在生理 pH 时,氨基质子化,羧基不质子化。

79

A. 一般性质

氨基酸的氨基和羧基容易电离,α-羧基的 pK 值(表 4-1,以 pK_1 表示)位于 2.2 附近的一个小范围,而 α-氨基的 pK 值(pK_2)几乎都接近 9.4。*在生理 pH 时(约 7.4),氨基质子化,羧基处于共轭碱形式(羧酸盐)*(图 4-2),因此氨基酸能以酸和碱两种形式起作用。表 4-1 也列出了含有可电离基团的侧链的 pK 值(pK_R)。

表 4-1　结构的秘诀：蛋白质中基本氨基酸的共价结构、缩写、出现频率及可电离基团的 pK 值

名称 三字母符号和 单字母符号	结构式[a]	残基质量 /Da[b]	蛋白质中 平均出现 频率/%[c]	pK_1 α-COOH[d]	pK_2 α-NH_3^+[d]	pK_R 侧链[d]
具有非极性侧链的氨基酸						
甘氨酸 Gly G	COO^- H—C—H NH_3^+	57.0	7.2	2.35	9.78	
丙氨酸 Ala A	COO^- H—C—CH_3 NH_3^+	71.1	7.8	2.35	9.87	
缬氨酸 Val V	COO^-　CH_3 H—C—CH NH_3^+　CH_3	99.1	6.6	2.29	9.74	
亮氨酸 Leu L	COO^-　　CH_3 H—C—CH_2—CH NH_3^+　　CH_3	113.2	9.1	2.33	9.74	
异亮氨酸 Ile I	COO^- CH_3 H—C—C*—CH_2—CH_3 NH_3^+ H	113.2	5.3	2.32	9.76	
甲硫氨酸 Met M	COO^- H—C—CH_2—CH_2—S—CH_3 NH_3^+	131.2	2.2	2.13	9.28	
脯氨酸 Pro P	H_2 COO^- C^3—$^4CH_2$ C^2　$^5CH_2$ H　N^1 H	97.1	5.2	1.95	10.64	
苯丙氨酸 Phe F	COO^- H—C—CH_2—(苯环) NH_3^+	147.2	3.9	2.20	9.31	
色氨酸 Trp W	COO^- H—C—CH_2—(吲哚环 1–7) NH_3^+　N—H	186.2	1.4	2.46	9.41	

续表

名称 三字母符号和 单字母符号	结构式[a]	残基质量 /Da[b]	蛋白质中 平均出现 频率/%[c]	pK_1 α-COOH[d]	pK_2 α-NH_3^+[d]	pK_R 侧链[d]
不带电荷的极性侧链的氨基酸						
丝氨酸 Ser S	$H-C(COO^-)(NH_3^+)-CH_2-OH$	87.1	6.8	2.19	9.21	
苏氨酸 Thr T	$H-C(COO^-)(NH_3^+)-C^*H(OH)-CH_3$	101.1	5.9	2.09	9.10	
天冬酰胺[e] Asn N	$H-C(COO^-)(NH_3^+)-CH_2-C(=O)NH_2$	114.1	4.3	2.14	8.72	
谷氨酰胺[e] Gln Q	$H-C(COO^-)(NH_3^+)-CH_2-CH_2-C(=O)NH_2$	128.1	4.3	2.17	9.13	
酪氨酸 Tyr Y	$H-C(COO^-)(NH_3^+)-CH_2-C_6H_4-OH$	163.2	3.2	2.20	9.21	10.46(酚基)
半胱氨酸 Cys C	$H-C(COO^-)(NH_3^+)-CH_2-SH$	103.1	1.9	1.92	10.70	8.37(巯基)
带电荷极性侧链的氨基酸						
赖氨酸 Lys K	$H-C(COO^-)(NH_3^+)-CH_2-CH_2-CH_2-CH_2-NH_3^+$	128.2	5.9	2.16	9.06	10.54 (ε-NH_3^+)
精氨酸 Arg R	$H-C(COO^-)(NH_3^+)-CH_2-CH_2-CH_2-NH-C(NH_2)=NH_2^+$	156.2	5.1	1.82	8.99	12.48(胍基)
组氨酸[f] His H	$H-C(COO^-)(NH_3^+)-CH_2-$(咪唑环，1 N-H，3 NH^+)	137.1	2.3	1.80	9.33	6.04(咪唑)

续表

名称 三字母符号和 单字母符号	结构式[a]	残基质量 /Da[b]	蛋白质中 平均出现 频率/%[c]	pK_1 α-COOH[d]	pK_2 α-NH_3^+[d]	pK_R 侧链[d]
天冬氨酸[e] Asp D	$H-C(COO^-)(NH_3^+)-CH_2-C(=O)O^-$	115.1	5.3	1.99	9.90	3.90 (β-COOH)
谷氨酸[e] Glu E	$H-C(COO^-)(NH_3^+)-CH_2-CH_2-C(=O)O^-$	129.1	6.3	2.10	9.47	4.07 (γ-COOH)

[a] 所示离子形式为 pH7.0 时的主要形式，而残基质量为中性化合物的质量。α 碳原子和那些标有一个星号的原子是按 Fischer 投影构型的手性中心，杂环按标准的有机化合物数字标记系统排位。

[b] 残基质量指中性残基质量，对母体氨基酸分子质量应加一分子水 18Da，侧链质量从残基质量中减去一个肽基团的质量，即 56Da。

[c] 根据 Fasman, G.D 汇编的 Predictions of protein structure and principles of protein conformation, Plenum press (1989)非多余蛋白质的 300688 个残基数据库计算而得。

[d] 资料来自 Dawson, R.M.C. *et al*. Data for Biochemical Research(第三版)pp.1-31. Oxford Science publications(1986).

[e] 天冬酰胺或天冬氨酸的三字母缩写符号是 Asx，单字母符号为 B，而谷氨酰胺或谷氨酸为 Glx 和 Z。单字母符号 X 表示未测定或非基本氨基酸。

[f] pH7.0 时，组氨酸的中性和质子化两种形式都存在，因为其 pK_R 值接近 7.0。

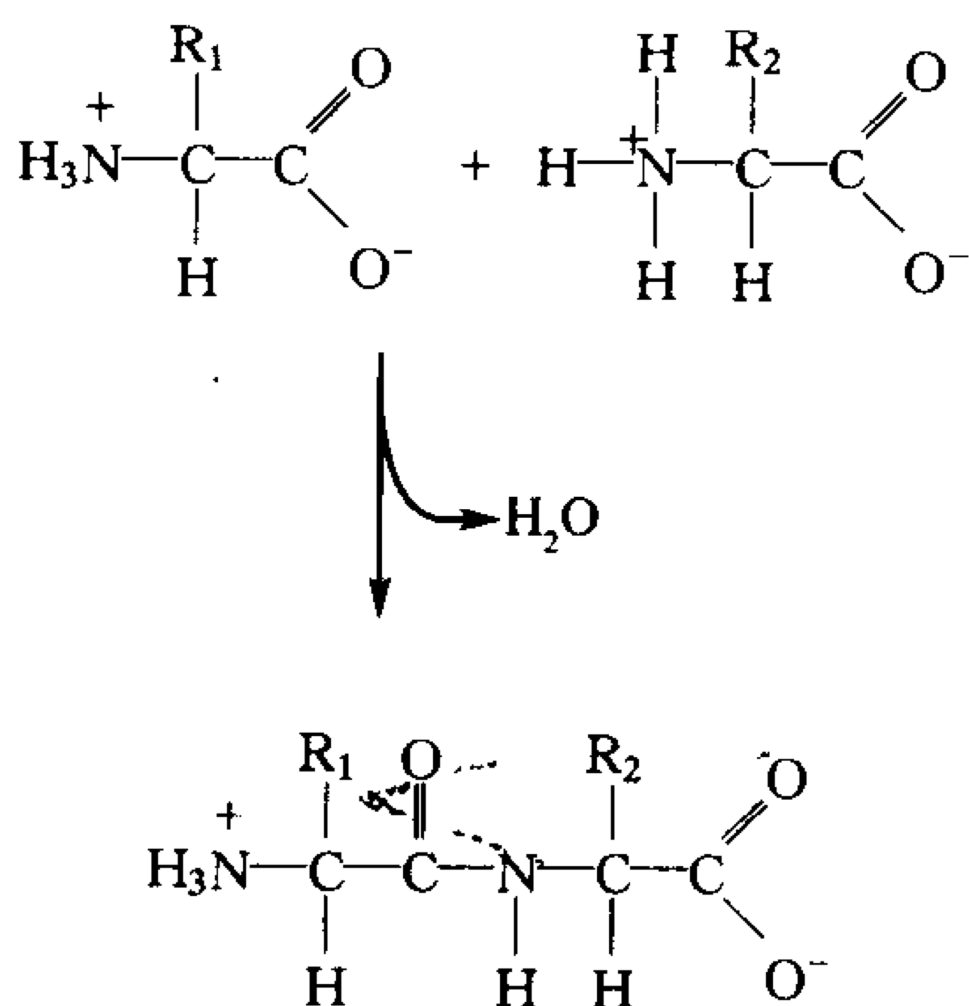


图 4-3 二个氨基酸的缩合

去除一分子水生成二肽，肽键以红色表示，有游离氨基的残基是肽的 N 端，有游离羧基的残基是 C 端。

氨基酸分子具有相反极性的电荷基团，故被称为**兼性离子**(zwitterion)或**偶极离子**(dipolar ion)。α-氨基酸的兼性离子性质已经被多种方法，包括分光光度法测定和 X 射线晶体结构测定所证实。氨基酸和其他离子化合物一样，在极性溶剂中比在非极性溶剂中易溶解。我们将会看到：侧链的离子性质影响自由氨基酸和蛋白质内氨基酸理化性质。

B. 肽键

氨基酸能聚合成链，这一过程可用去水**缩合**(condensation)反应来表示(如图 4-3 所示)，缩合产生的 CO—NH 酰胺键被称为**肽键**(peptide bond)。

由二个、三个、几个(3～10)或许多氨基酸单位构成的聚合物，分别被称作**二肽**、**三肽**、**寡肽**和**多肽**，常常简单地把它们说成肽，而构成肽的单个氨基酸被称为**氨基酸残基**。

多肽是线性聚合物，即每个氨基酸残基参加二个肽键，与邻近的氨基酸以首尾相连的方式连结，而不形成支链。位于肽两端的残基仅参与一个肽键，具有自由氨基的残基叫做**氨基端**或 N

端，有自由羧基(右侧)的残基称为**羧基端**或 **C 端**。蛋白质是包含一个或多个肽链的分子，多肽的长度和氨基酸序列的变化决定了蛋白质形态和生物功能的多样性。这些内容将在以后的章节中介绍。

C. 分类和特性

20 种基本氨基酸的最常用分类方法是按它们侧链的极性分类，有三种主要类型：①具有非极性 R 基团，②不带电荷的极性 R 基团，③带电荷的极性 R 基团。

非极性氨基酸侧链有多种形状和大小

83

9 种氨基酸被归入具有非极性侧链一类，它们中的某些氨基酸的三维形状见图 4-4。**甘氨酸**具有最小的侧链——氢原子。**丙氨酸**、**缬氨酸**、**亮氨酸**和**异亮氨酸**具有脂族侧链，这一侧链的大小范围可从丙氨酸的甲基直到亮氨酸和异亮氨酸的同分异构体丁基。**甲硫氨酸**(蛋氨酸)有一个硫醚侧链，在许多物理性质方面类似于正丁基(碳和硫有近似相等的电负性，硫的大小几乎和亚甲基相当)。**脯氨酸**有一个环状的吡咯侧链，**苯丙氨酸**(有苯基侧链)和色氨酸(有吲哚侧链)具有芳香环侧链，以体积大和无极性为其特性。

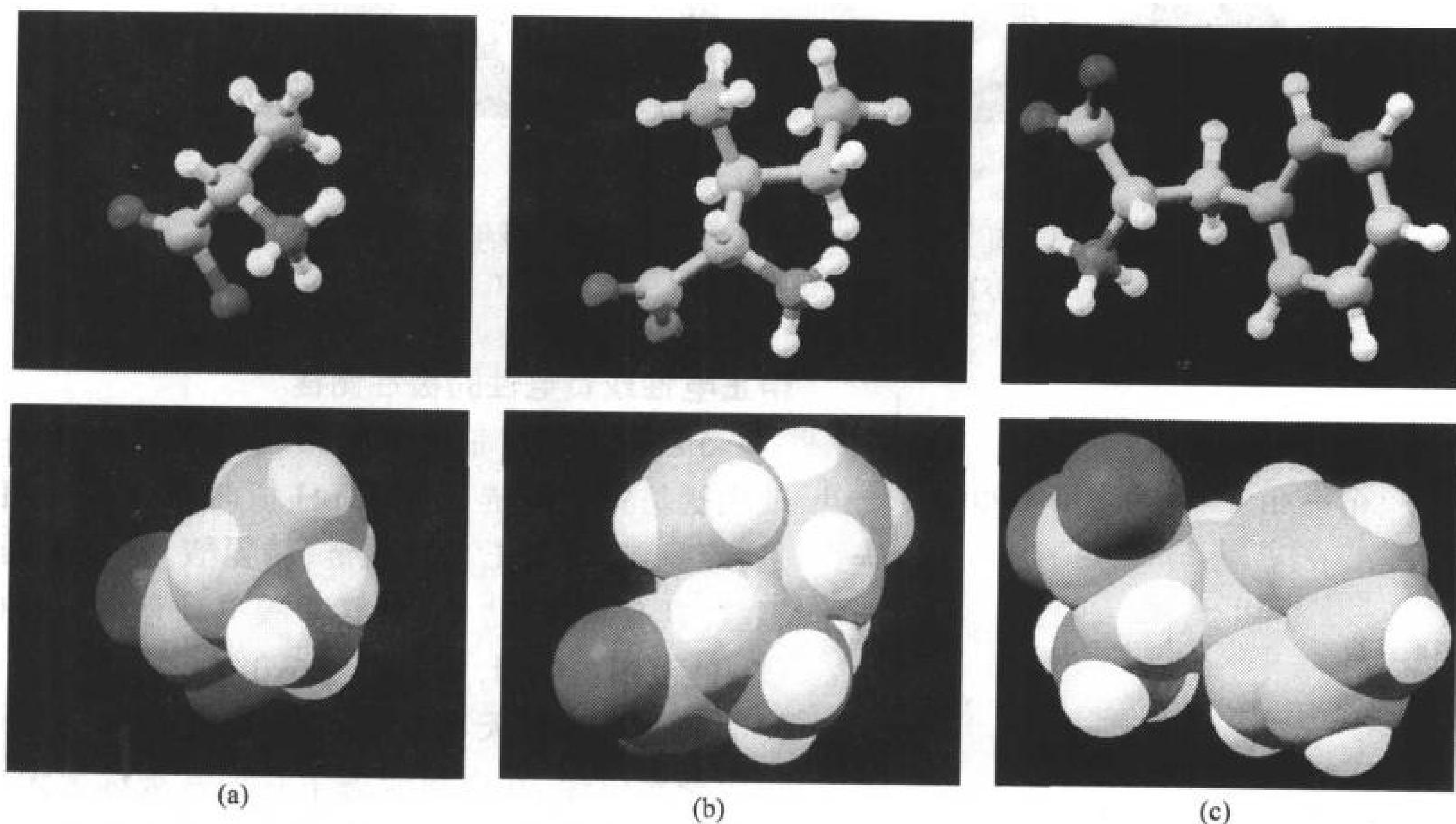


图 4-4 几种非极性侧链氨基酸的模型

上部图为球棒结构，下部图为相应填充空间模型，表示 3 种氨基酸。(a)丙氨酸。(b)异亮氨酸。(c)苯丙氨酸。所有模型按照同一比例绘制，C 绿色、N 蓝色、H 白色。

不带电荷的极性侧链有羟基、酰胺或巯基

有 6 种氨基酸通常被归入不带电荷的极性侧链氨基酸类(表 4-1 和图 4-5)。**丝氨酸**和**苏氨酸**有不同大小的羟基 R 基团，**天冬酰胺**和**谷氨酰胺**有不同体积大小的酰胺侧链，而**酪氨酸**有酚基(如同苯丙氨酸、色氨酸，都带芳香基)。**半胱氨酸**是 20 种氨基酸中惟一的一个有巯基的氨基

酸，它能与另一个半胱氨酸通过氧化二个巯基形成二硫键（图 4-6），其二聚体在以往的生化文献里被称为**胱氨酸**，而半胱氨酸有时也被称为半个胱氨酸残基。

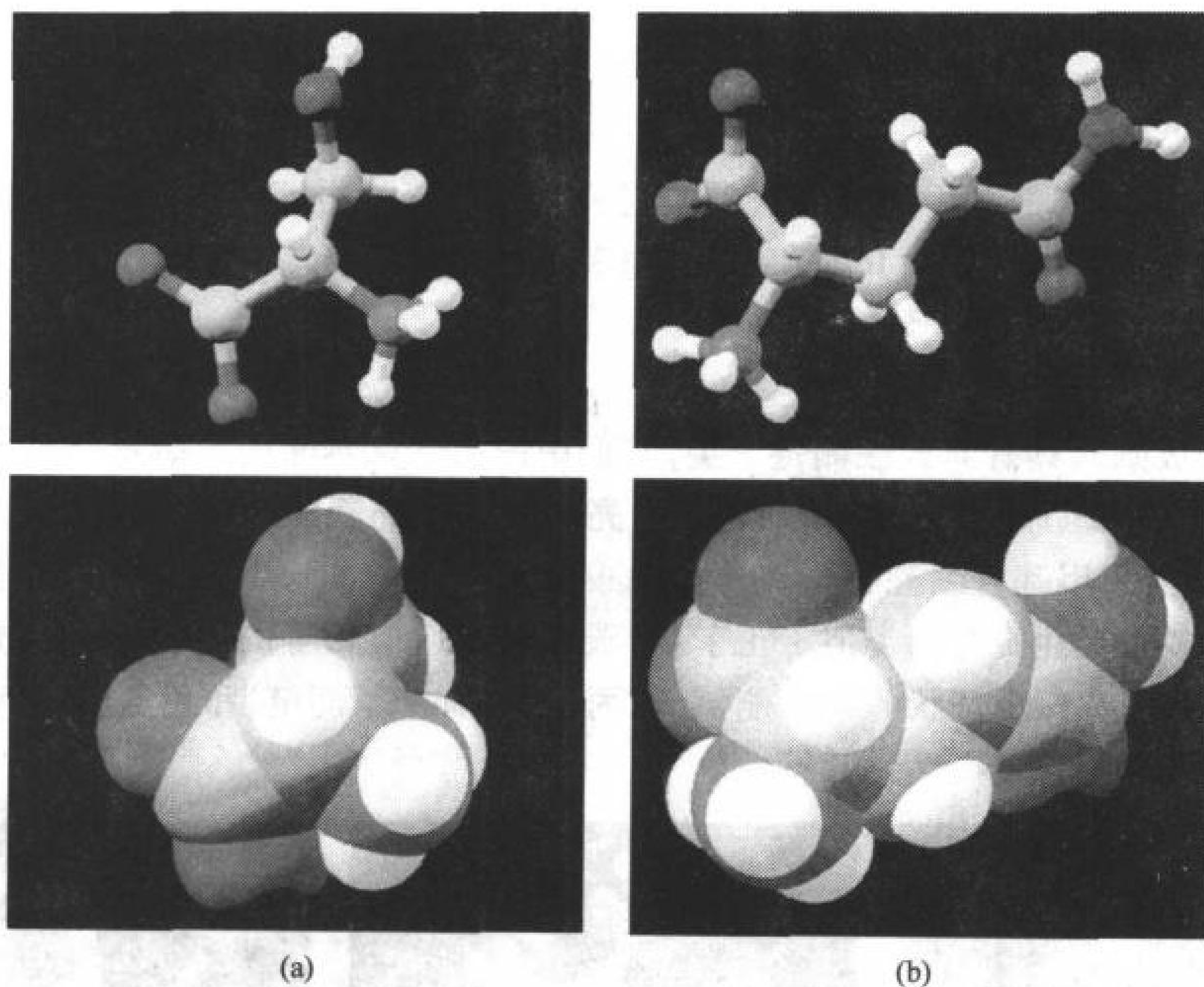


图 4-5　几种不带电荷的极性侧链氨基酸的模型
(a)丝氨酸。(b)苏氨酸，原子呈色同图 4-4。注意侧链存在带负电荷的原子。

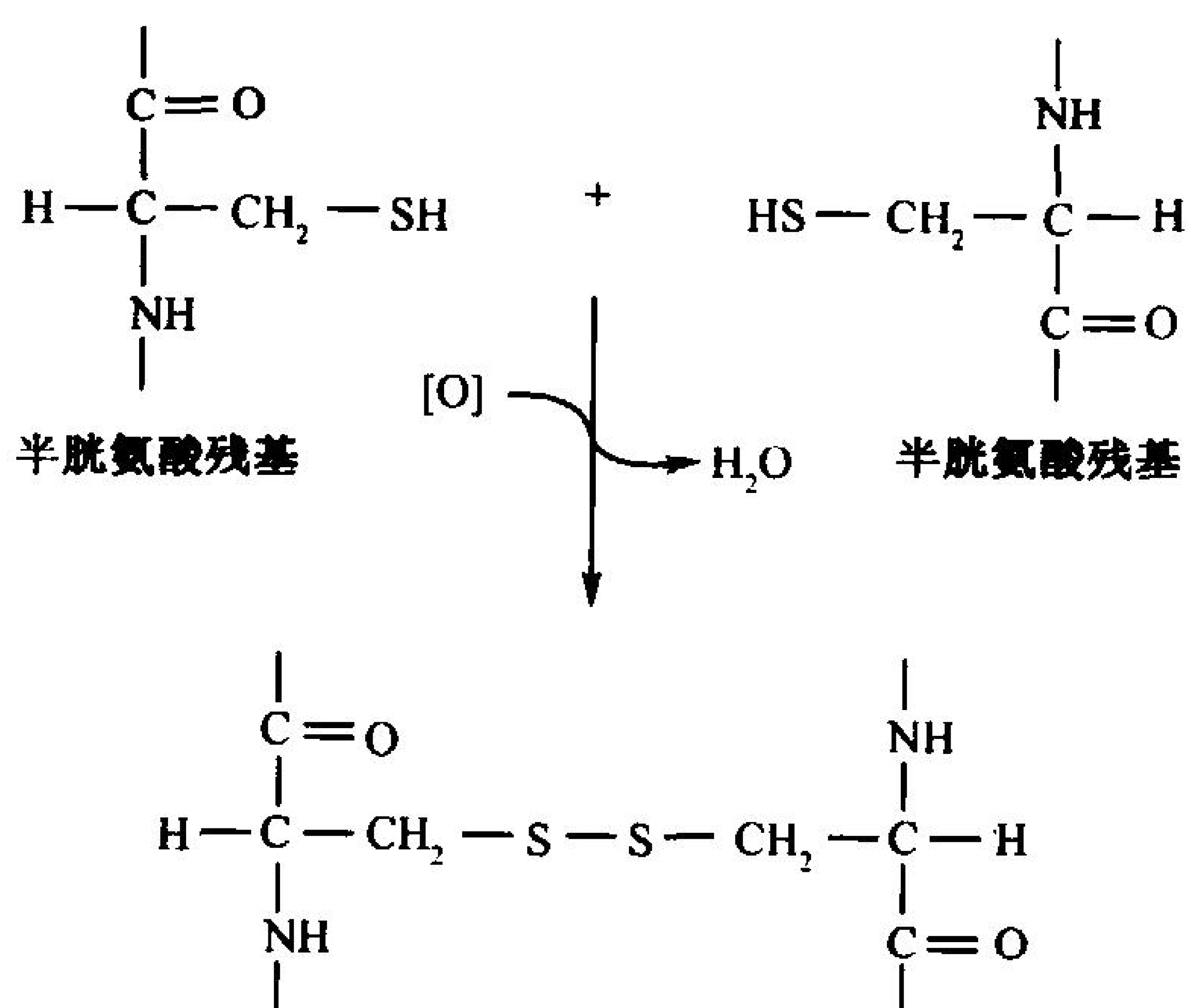


图 4-6　二硫键连接的半胱氨酸残基
当二个巯基被氧化时二硫键形成。

带正电性或负电性的极性侧链

5 种氨基酸有带电性的侧链（表 4-1 和图 4-7）。碱性氨基酸的侧链在生理 pH 值时呈正电性，它们是：**赖氨酸**，具有正丁胺侧链；**精氨酸**，具有胍基；**组氨酸**，具有咪唑基。20 种氨基酸中只有组氨酸在生理 pH 范围内电离，其 $pK_R = 6.0$。

酸性氨基酸**天冬氨酸**和**谷氨酸**的侧链在 pH3 以上呈负电性，在电离状态下它们常被称为**天冬氨酸根**和**谷氨酸根**，天冬酰胺、谷氨酰胺分别是它们的酰胺。

20 种氨基酸在上述 3 种不同侧链类型中的分配颇为任意。例如，甘氨酸和丙氨酸是最小的二个氨基酸，而色氨酸具有杂环，却都把它们分类为不带电荷的极性氨基酸。同样具有可电离侧链的酪氨酸和半胱氨酸被认为是带电性的极性氨基酸，尤其是在较高 pH 值时。

某一特定氨基酸被归入这一类或另一类，不但反映了它们孤立的氨基酸性质，也反映了它们作为肽的一部分表现出的行为。大多数肽的结构取决于极性和离子化侧链的溶剂化倾向和非极

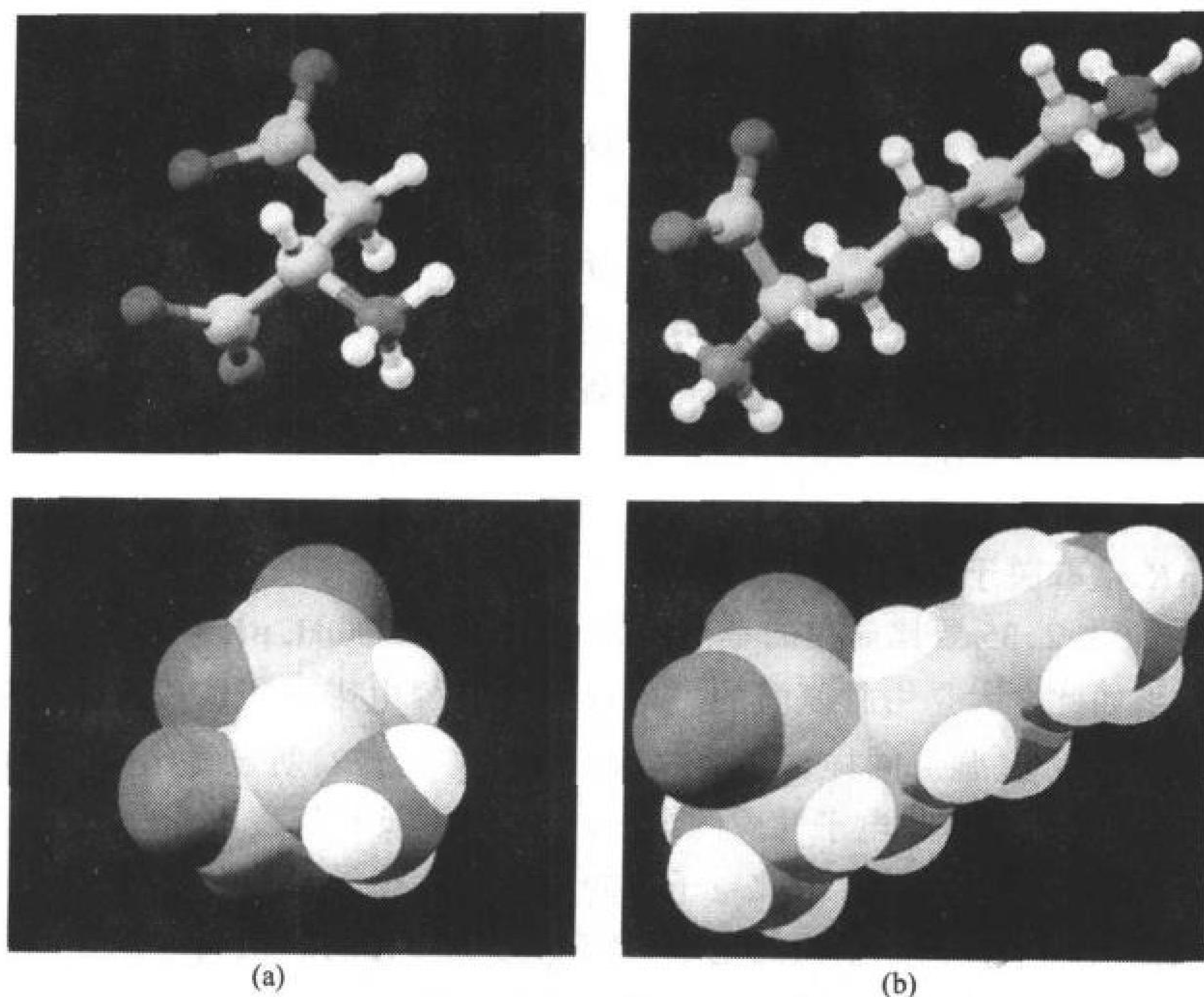


图 4-7　几种带电荷极性侧链氨基酸的模型
(a)天冬氨酸。(b)赖氨酸,原子呈色表示同图 4-4。

性侧链间的相互作用,而不是和水作用。多肽的这一性质是疏水效应(节 2-1C),下面我们将要学习氨基酸侧链的理化性质也支配着多肽的化学反应性。为了正确认识氨基酸的极性、酸度、芳香环程度、大小、构象柔韧性、交联能力、氢键能力和对其他基团的反应性等方面是如何变化的,值得花些时间学习 20 种基本氨基酸的结构。

D. 酸-碱性质

α-氨基酸具有二个或三个(那些具有可电离侧链的 α-氨基酸)酸-碱基团。最简单的氨基酸甘氨酸的滴定曲线如图 4-8 所示,在低 pH 值时甘氨酸的酸-碱基团全都质子化,因此以阳离子形式($^+H_3NCH_2COOH$)为主,在用强碱如 NaOH 滴定过程中甘氨酸逐步失去二个质子。甘氨酸的两个可电离基团的 pK 值明显不同,因此 Henderson-Hasselbalch 方程式(节 2-2B)

$$pH = pK + \lg([A^-]/[HA]) \qquad [4\text{-}1]$$

可充分描述滴定曲线的每一侧枝。因而,每一电离步骤的 pK 值相应于滴定曲线侧枝的中点值(节 2-2C)。在 pH2.35 时,阳离子形式 $^+H_3NCH_2COOH$ 和兼性离

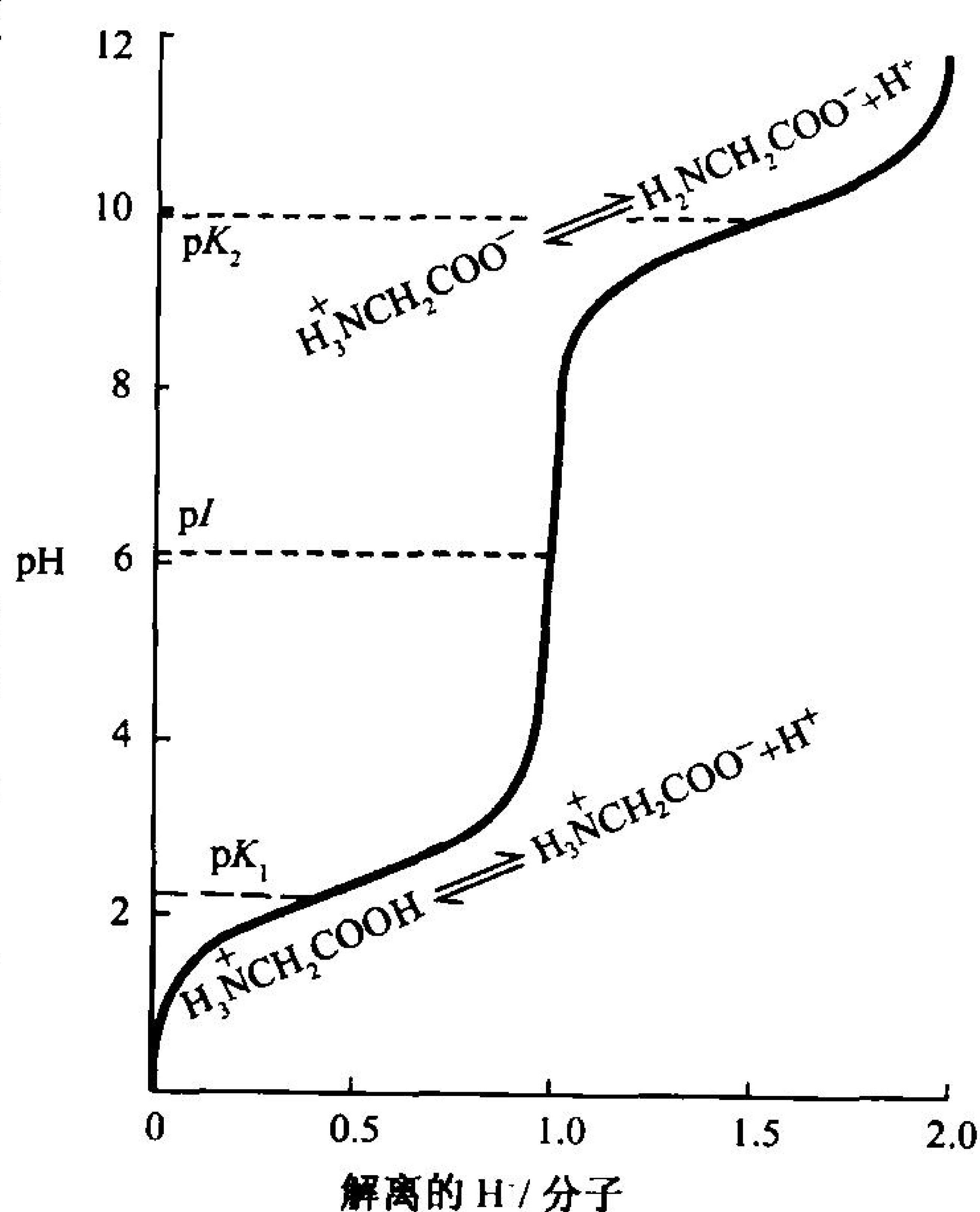


图 4-8　甘氨酸的滴定曲线
[引自 Meister, A., Biochemistry of Amino Acids (2nd ed.), Vol.1, p.30, Academic press (1965)]

子形式$^+H_3NCH_2COO^-$浓度相等，同样在 pH 9.78 时兼性离子和阴离子形式$H_2NCH_2COO^-$的浓度相等。要注意，*决不能认为氨基酸在水溶液里是中性的*。

分子不携带净电荷时的 pH 被称为**等电点 p*I***。就 α-氨基酸而言，用 Henderson-Hasselbalch 方程式可高度精确表示等电点为：

$$pI = 1/2(pK_i + pK_j) \qquad [4-2]$$

此处 K_i 和 K_j 是中性形式涉及的两步电离作用的解离常数。对单氨基单羧基的氨基酸如甘氨酸，其 K_i 和 K_j 代表 K_1 和 K_2，对于天冬氨酸和谷氨酸其 K_1 和 K_2 代表 K_1 和 K_R，但对于精氨酸、组氨酸和赖氨酸则代表 K_R 和 K_2。

85

可电离基团的 p*K* 值取决于附近基团

甘氨酸的 pK_1 为 2.35 要比简单的单羧酸如乙酸(CH_3COOH, $pK = 4.76$)低得多，同一功能基团的 p*K* 值差别如此之大是由甘氨酸的正电性氨基的静电影响所造成的。NH_3^+ 的静电性稳定 COO^- 要比稳定 COOH 强。同样甘氨酸的 NH_3^+($pK_2 = 9.78$)明显要比脂族胺($pK \approx 10.7$)偏酸性，这是因为甘氨酸的羧基吸电子性质的缘故，但是它不及甘氨酸乙酯($pK = 7.75$)的酸度大，甘氨酸乙酯的羧基是不带电荷的。因此电子和静电两种效应影响着 NH_3^+ 的 p*K* 值。

一个功能基团对另一种功能基团的电子影响取决于二者间的距离。例如，赖氨酸侧链氨基(与 α 碳相隔 4 个亚甲基)的电离常数与脂族胺就没有差别。

当然，氨基酸残基位于多肽链的内部，没有能电离的自由氨基和羧基(它们已加入肽键，图 4-3)。此外，所有能电离基团的 p*K* 值包括 N 端和 C 端的可电离基团可能都不同于表 4-1 列出的游离氨基酸的 p*K* 值。α-羧基在不折叠的蛋白质里的 p*K* 值在 3.5～4.0 范围内，而 α-氨基的 p*K* 值在 8.0～9.0 范围内。折叠肽链的三维结构会引起极性侧链和 N 端、C 端靠近，结果这些基团间的相互静电作用会使它们比相应的游离氨基酸的 p*K* 值偏移达几个 pH 单位。

E. 命名简述

表 4-1 列出的 20 种基本氨基酸的 3 字母缩写已被广泛应用于生物化学文献，这种缩写大都取自相应氨基酸名称的前 3 个字母，并按拼写发音。符号 Glx 表示 Glu 或 Gln，同样 Asx 意为 Asp 或 Asn。这一意义不明确的标志来源于实验室的经验：Asn 和 Gln 容易水解成 Asp 或 Glu，在酸或碱条件下常可从蛋白质回收它们(节 5-3A)，无特别需要，不必说出检测到的 Glu 究竟先是 Glu 还是 Gln，同样情况也适用于 Asp 和 Asn。

氨基酸的单字母表示也列在表 4-1 里，这是一种更紧凑简洁的代码，常用于比较相似蛋白质的氨基酸序列。单字母代码通常用氨基酸名称的第一个字母，然而当一组残基有相同的第一字母时，实际上仅以该组残基中最丰富的残基采用第一个字母作其代码。

多肽里的氨基酸残基命名采取删除其名称后缀-ine，代之以-yl。多肽链的表示从 N 端开始进行到 C 端，C 端氨基酸给予其原有的名称。因此，下页的短肽被叫做丙氨酰酪氨酰天冬氨酰甘氨酸。显然这种命名对有数个以上残基的多肽来讲是极其麻烦的，上述四肽按三字母缩写也能写成 Ala-Tyr-Asp-Gly，用单字母缩写即为 AYDG。

86

氨基酸侧链的各原子常以希腊字母如 α、β 来表示顺序，以紧邻肽键羧基的碳作为起点。因此如图 4-9 所示，赖氨酸有一个 ε-氨基，谷氨酸有一个 γ-羧基。遗憾的是，这种标志系统对某些氨基酸还是含糊不清的，因此有机分子的标准数字示意有时还会被使用(表 4-1 所示的杂环侧链)。

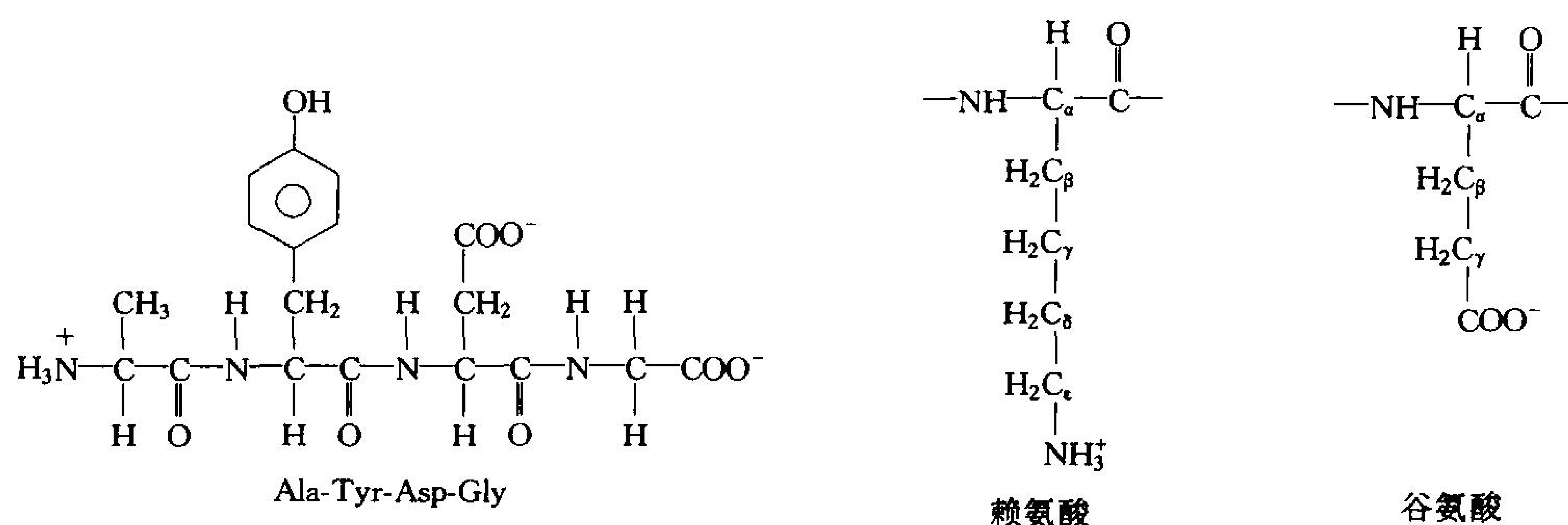


图 4-9　氨基酸的希腊字命名
碳原子顺序指定采用希腊字母，以紧邻羧基的碳为起始点。

2. 立体化学

所有从多肽中回收的氨基酸，除甘氨酸外，都是**光学活性的**(optically active)。也就是说，它们能够旋转偏振光平面，使用**旋光仪**(polarimeter)就能测量旋转的方向和角度(图 4-10)。

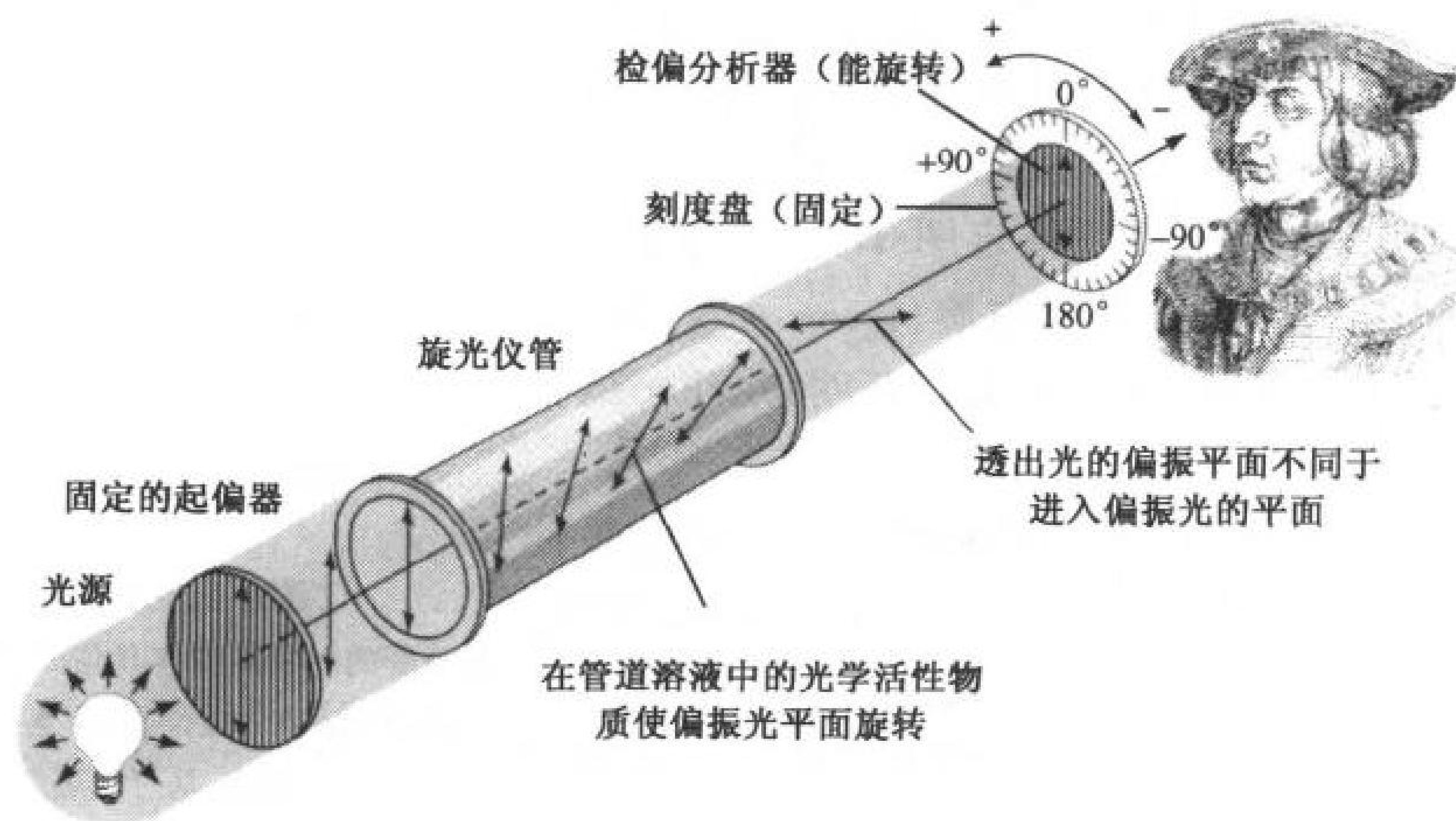


图 4-10　旋光仪的示意图
可用于测量光的旋转

光学活性分子是不对称的，即它们不能被叠置在其镜像体上面，就像左手不能与其镜像右手重叠一样，这是含有 4 个不同取代基的四面体碳原子物质的特性。图 4-11 描绘的两个分子是不可能叠置的，因为它们是对映体。这种分子的中心原子被称为**不对称中心**(asymmetric center)或**手性中心**(chiral center)，也被称为具有**手性**(chirality)。氨基酸的 α-碳原子(甘氨酸除外)是不对称中心，甘氨酸的 α-碳原子连接两个氢原子，能与它的镜像体叠置，因此是没有光学活性的。除氨基酸外许多生物分子有一个或多个手性中心。

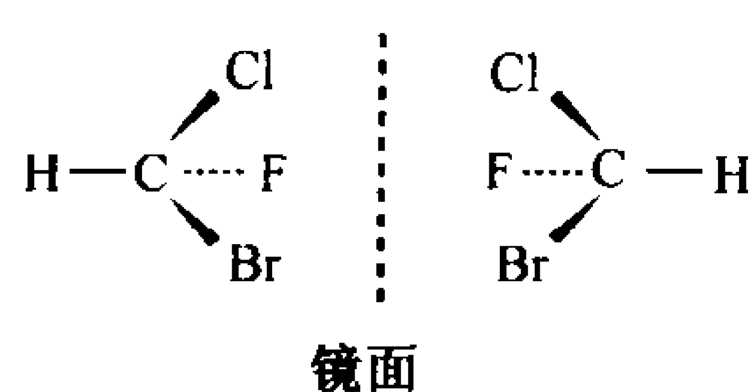


图 4-11 氟氯溴甲烷的二个对映异构体

4 个取代基以四面体形式围绕中心碳原子排列，点线表示取代基位于纸平面后，楔形线表示在纸平面上面，细线表示在纸平面里，镜平面以垂直的划线表示。

87

手性中心产生对映异构体

不能叠置的镜像体分子相互被称作**对映异构体**(enantiomer)，对映异构体在物理和化学上用大多数技术是难以区分的。只有用不对称探测手段，例如平面偏振光或具有手性中心反应物时，才能将对映异构体区分或者进行差异操作。

遗憾的是，在分子结构和旋转平面偏振光的方向与程度之间没有明确的关系。譬如，从蛋白质中分离得到的亮氨酸将偏振光左旋 10.4°，而精氨酸却向右旋转偏振光 12.5°(它们各自的对映异构体旋转偏振光的程度相同，但方向相反)。迄今为止尚不能根据分子结构预测光学旋转性，也不能根据光学旋转的测量推知手性中心周围化学基团的**绝对构型**(absolute configuration)(空间排列)。

Fischer 规则描述不对称中心的构型

生物化学家通常使用 **Fischer 规则**描述手性分子的不同形式。这一系统是将环绕不对称中心的基团的构型与**甘油醛**构型相比较，甘油醛是仅有一个不对称中心的分子。1891 年，Emil Fischer 提出把甘油醛的空间异构体或**立体异构体**(stereoisomer)指定为 D-甘油醛和 L-甘油醛(图 4-12)。前缀 L(注意使用小的大写字母)表示偏振光向左旋(希腊文：levo, left)，而前缀 D 表示偏振光向右旋(希腊文：dextro, right)。Fischer 指定图 4-12 中的各个结构前缀时并不知道其结构究竟是**左旋**(levorotatory)还是**右旋**(dextrorotatory)，直至 1949 年实验证明 Fischer 的猜测确实是正确的。

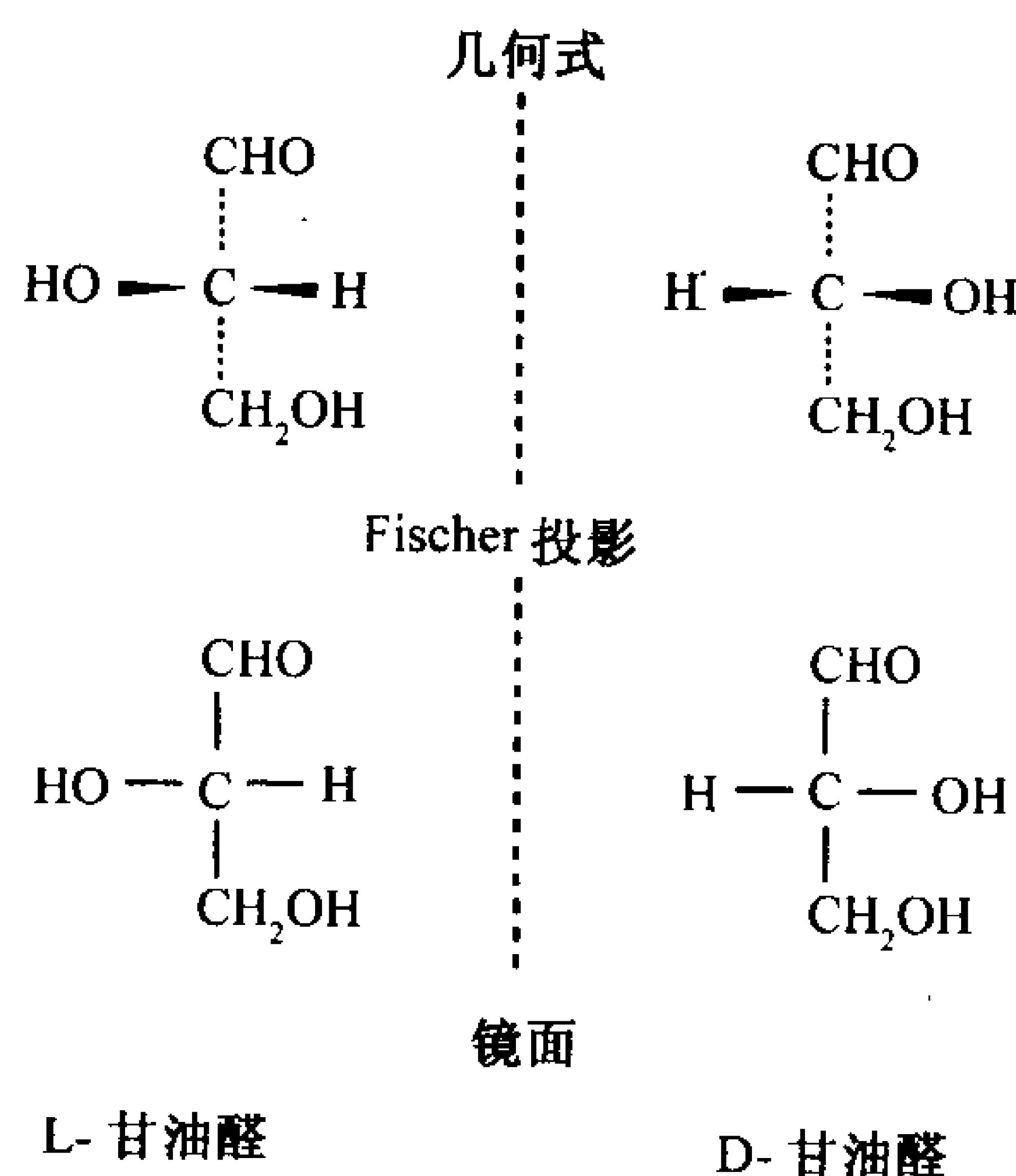
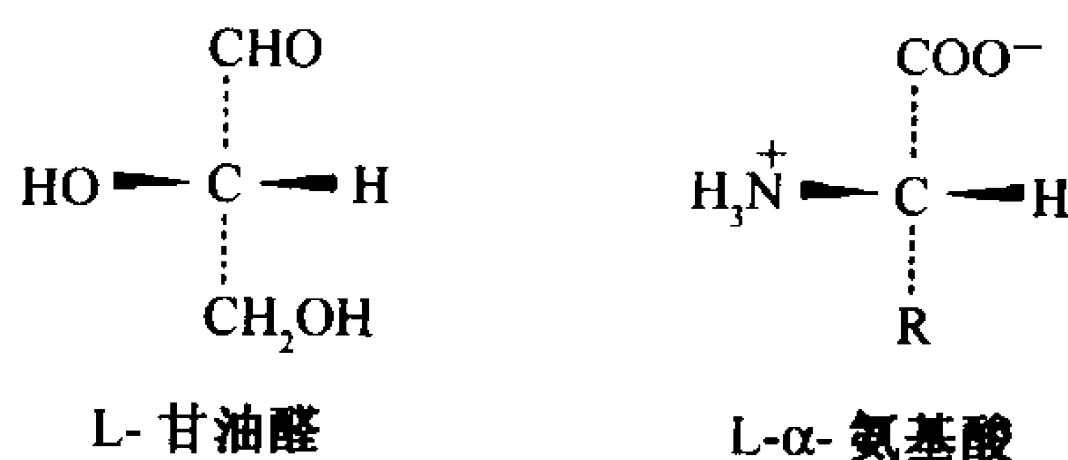


图 4-12 Fischer 规则

甘油醛的对映异构体几何式见图上部，投影图见图下部。在 Fischer 投影里，水平线表示延伸在纸平面上的键，垂直线表示延伸在纸平面下面的键盘(在有些 Fischer 投影图里，中心手性碳原子并不明确表示出来)。

Fischer 也提出分子构型的速记标记法，这一方法被称为 **Fischer 投影法**，也在图 4-12 中给出。Fischer 规则里，水平键延伸在纸平面上面，垂直键则延伸在纸平面下面。

环绕任何手性中心的基团的构型通过化学转化成甘油醛的基团，从而与甘油醛的构型相关联。例如 α-氨基酸，氨基、羧基、R 和 H 基团环绕 α-碳原子分别相当于甘油醛的羧基、醛基、CH_2OH 和 H。



因此，L-甘油醛和 L-α-氨基酸可被视为具有相同的**相对构型**(relative configuration)，所有来自蛋白质的氨基酸有 L 型立体化学构型，也就是说它们围绕 α-碳原子都具有相同的相对构型。当然，一个氨基酸的 L 和 D 标记并不表明它旋转偏振光平面的能力，许多 L-氨基酸是右旋的。

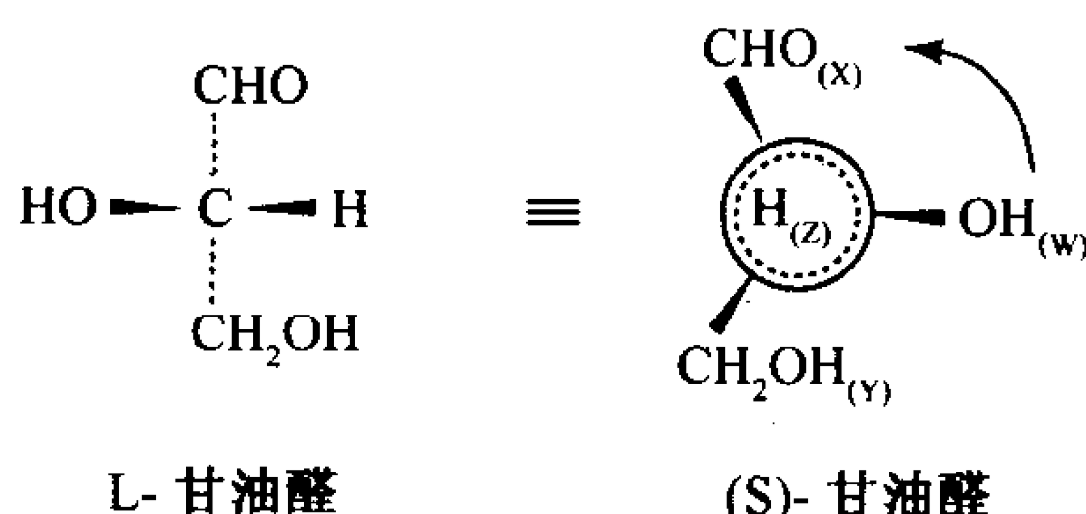
Fischer 体系也有某些不足，尤其是对有多个不对称中心的分子。每个不对称中心能有二种可能的构型，因此一个分子如有 n 个手性中心，它就会有 2^n 个可能不同的立体异构体。例如，苏氨酸和亮氨酸都有两个手性碳原子，因此这两个氨基酸都有 4 种立体异构体或二对对映异构

体[L型的对映异构体(镜像)是D型]。对大多数目的而言,Fischer体系能对生物分子提供充分的描述,生物化学家有时也会使用更为精确的命名系统(见框4-1)。

框4-1 生物化学焦点

RS系统

Robert Cahn、Christopher Ingold和Vladimir Prelog在1956年设计了一个适用于有一个以上不对称中心分子构型的精确描述系统。在Cahn-Ingold-Prelog或RS系统中,围绕手性中心的四个基团按照特定的但任意的优先次序来分等,原子数高的原子排在较轻原子之前(例如,—OH置于—CH_3前),如果第一个取代原子相同,排序则根据离手性中心最近的另一个原子轻重而定(例,—CH_2OH优先于—CH_3)。一些常见功能基团的优先次序为:$SH > OH > NH_2 > COOH > CHO > CH_2OH > C_6H_5 > CH_3 > H$。优先化基团用字母W、X、Y、Z表示,其次序为W>X>Y>Z。建立手性中心的构型,可从不对称中心向Z基团(最低优先)观察而得,如果基团的次序W→X→Y是顺时针的,那么构型被指定为R(拉丁语:rectus, right);如果基团次序W→X→Y是逆时针的,则构型为S(拉丁语:sinistrus, left)。



L-甘油醛是(S)-甘油醛,因为当氢原子(虚线)被置于手性碳原子(大圆圈)的后面时,三个高位序基团排列是逆时针的。蛋白质中所有的L-氨基酸都是(S)-氨基酸,半胱氨酸是例外,因为侧链的S增加了它的序位,使它成为(R)-半胱氨酸。其他密切相关的化合物在Fischer DL规则下具有相同的(构型)标示,但用RS系统可能会有不同的标示。RS系统对描述有多个不对称中心的化合物手性时显得特别有用,因此L-苏氨酸也能被称作(2S,3R)-苏氨酸。

生命基于手性分子

通常化学合成手性分子,生成**外消旋**(racemic)混合物(含有等量的每种对映异构体)。为了获取一个纯净的不对称产物,必须应用手性过程。生命的最显著特性就是生成光学活性的分子。生物合成过程几乎能恒定不变地制造纯净的立体异构体,蛋白质的氨基酸残基全都是L-构型,这一事实就是这种现象的一个例证。由于大多数生物分子具有手性,作为单一对映体形式存在的特定分子将与另一化合物的单一对映体发生结合或反应。例如,L-氨基酸残基构成的蛋白质能与特定的L-氨基酸反应而不易与D-氨基酸反应,而由D-氨基酸残基合成的蛋白质也只能与相应的D-氨基酸发生反应。 88

生命体系中立体化学的重要性也与制药工业有关,许多药物是作为外消旋混合物化学合成的,尽管只有一种对映异构体有生物活性。许多情况下,相反的对映异构体在生物学上是惰性的,但却与活性的配对物一起包装,这确实是事实。譬如,抗炎剂**异丁苯丙酸**(ibuprofen)仅仅只有一种对映异构体在生理学上是有活性的(图4-13)。有时有用药物的对映异构体会产生有害作用,就必须从外消旋混合物中予以清除。最引人注目的例子是**酞谷酰亚胺**(thalidomide)(图4-14),它是一种温和的镇静剂,而没有活性的对映异构体能引起严重分娩缺陷。

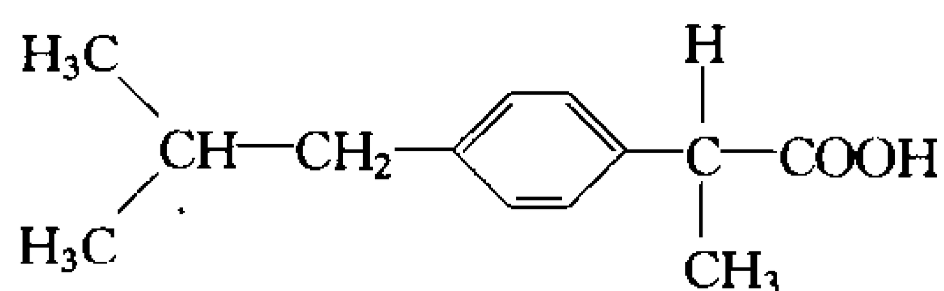


图 4-13 异丁苯丙酸(布洛芬, ibuprofen)
只有图示的对映异构体有抗炎作用,手性碳以红色表示。

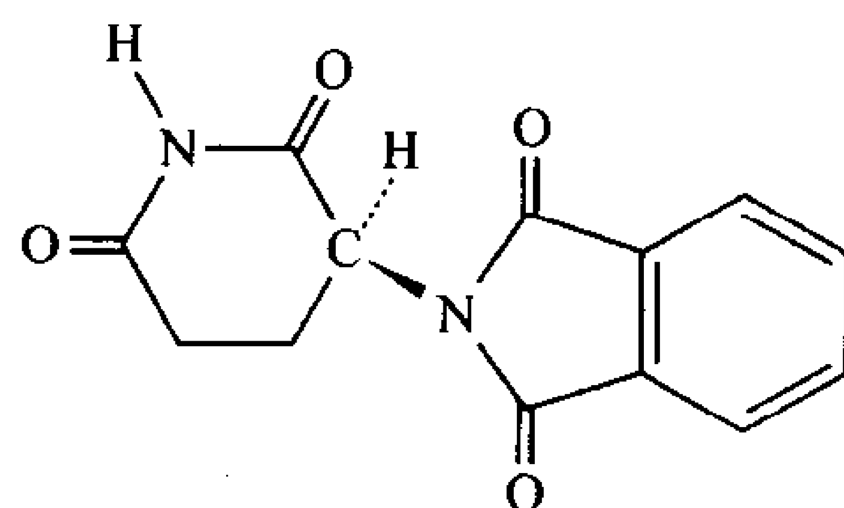


图 4-14 酞谷酰亚胺(萨立多胺, thalidomide)
该药物作为一种温和的镇静剂,早在 20 世纪 60 年代欧洲就广泛应用。它的无活性对映异构体以同等量存在于应用的制剂里,会对妊娠头三个月服用的人产生严重的分娩缺陷,通常它用于减轻妊娠期的恶心。

框 4-2 生物化学相关内容

为何蛋白质是由 20 种氨基酸所组成?

蛋白质中几乎无例外地用 L-氨基酸而不用 D-氨基酸,这就产生了这样的一个疑问,为何自然选择 L-氨基酸而不选择 D-氨基酸?为什么只是这 20 种氨基酸而没有好几十种中的其他一种氨基酸掺入蛋白质中?

没有令人信服的化学或物理理由能解释为何 L-氨基酸要比 D-氨基酸优先。D-氨基酸和 L-型氨基酸同等稳定,由 D-氨基酸构成的蛋白质在生理学所有其他方面与它的 L-配对物相同。对数百种已知氨基酸很快的扫视就会发现,用于构建蛋白质的这些少数氨基酸并不代表自然界中最丰富和最易合成的,甚至在化学上也不是最活泼的。

现代蛋白质的有限构成的理由深藏于进化的最早时期,仅能通过推论来理解。最早出现在地球上的氨基酸或许是外消旋的混合物,因为它们纯碎是由化学事变产生的,有可能生命的某些初期形式使用 D-氨基酸,但被偶然使用了 L-氨基酸的更有效的生命形式所超越。其他机会的发生决定了 20 种氨基酸成为构建蛋白质的原料。目前生物学过程的专一性(和立体专一性)是如此完全,以至 20 世纪初研究人员就能利用生物学来纯化某些 D-氨基酸:当动物被饲以氨基酸外消旋混合物,它们代谢 L-氨基酸,不代谢 D 型异构体,因此将其排泄,这种未被利用的氨基酸几乎全都是 D 型。

正如人类不可能突然产生鳃或者长出翅那样(尽管它们是有用的),含有 D-氨基酸的蛋白质也不会出现。在进化观点上,L-氨基酸深深绊缠在细胞的生物化学结构中,以至于 D-氨基酸也不能参加任何由 L-氨基酸逐渐演化而成的过程,虽然从严格的化学观点看是可取的。本质上讲,现代蛋白质是由 20 种 L-氨基酸组成,因为不再有任何的取舍存在了。

89

3. 非基本氨基酸

生物体系中存在的氨基酸决不仅仅是 20 种常见的氨基酸。非基本氨基酸残基常常是蛋白质和生物活性肽的重要成分。此外,有些氨基酸完全不是多肽的组成成分,但独立扮演多种生物学作用。

A. 蛋白质中的氨基酸衍生物

通用的遗传密码在所有已知的生命形式里几乎是相同的(节 26-1C),只编码列于表 4-1 中的

20 种氨基酸。然而许多其他氨基酸，其中一些（图 4-15）是某些蛋白质的组成成分。在几乎所有情况中，这些非基本氨基酸都是肽链合成后通过氨基酸残基专一修饰的结果。

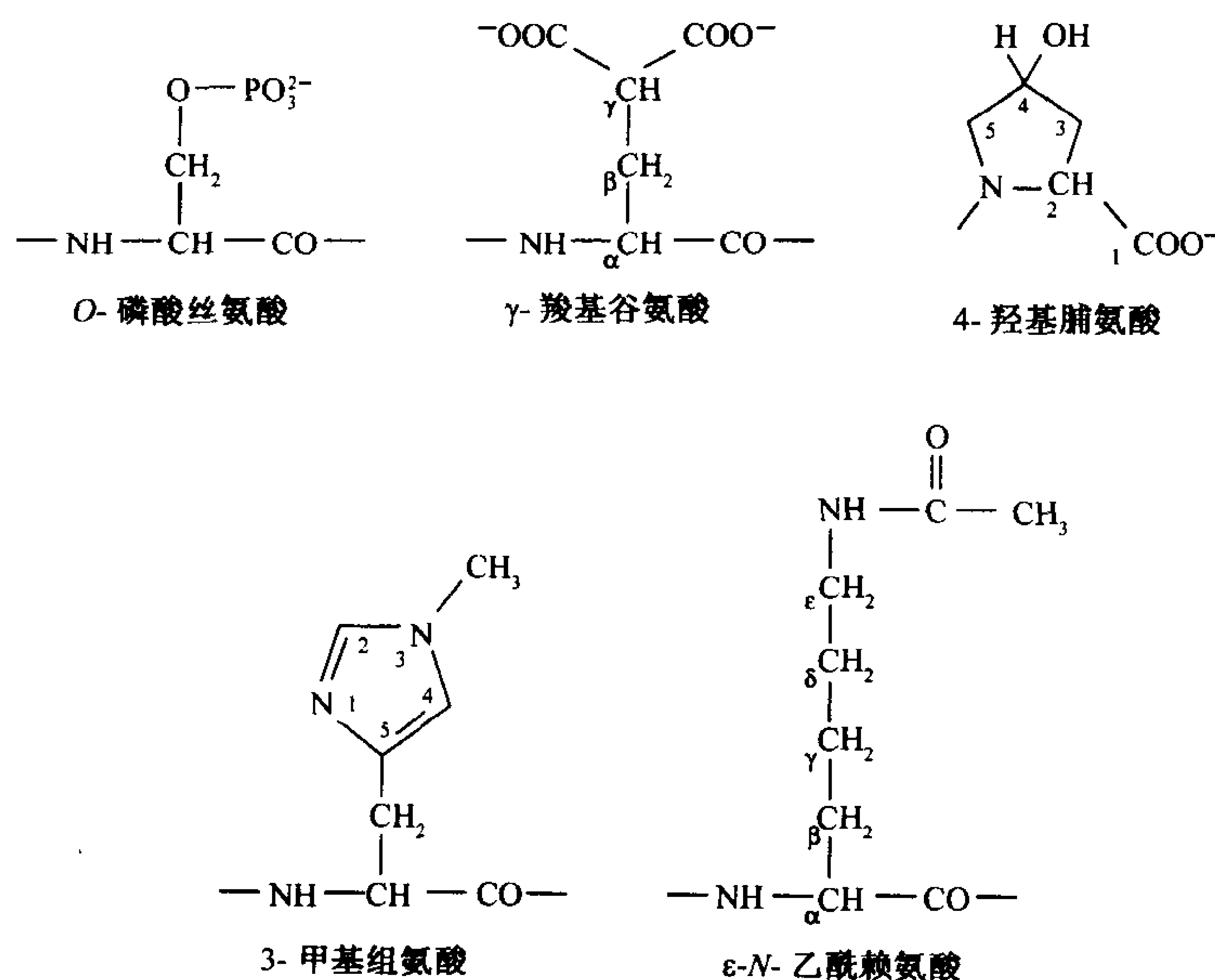


图 4-15　蛋白质中一些修饰的氨基酸残基

这些残基侧链是在肽合成后，从 20 种氨基酸中的任一个衍生而来。基本 R 基团为红色，修饰基团为蓝色。

氨基酸修饰包括小的化学基团简单加合到某些氨基酸的侧链上，如羟基化、甲基化、乙酰化、羧基化和磷酸化。大基团包括脂和糖聚合物连接到某些蛋白质特定的氨基酸残基上，也发现有些氨基酸还有更为精细的化学修饰。肽的 N 端氨基和 C 端羧基也能被化学修饰。多数情况下，修饰对蛋白质的功能即使不是必需的也是重要的。

B. D-氨基酸

D-氨基酸是某些较短细菌多肽的组成部分（小于 20 个残基），这些多肽广泛存在于细菌的细胞壁成分中（节 8-3B）。D-氨基酸的存在使细菌细胞壁对**肽酶**（peptidase）的攻击变得不太敏感（肽酶是水解肽键的酶）。肽酶由其他的生物体产生，用于消化细菌。D-氨基酸也是许多细菌所产生的肽类抗生素的组成部分，如**缬氨霉素**（valinomycin）、**短杆菌肽 A**（gramicidin A）和**放线菌素 D**（actinomycin D）等（框 25-2）。

90

大多数含有 D-氨基酸的肽并非以标准的蛋白质合成机制所合成，在这种标准机制中信使 RNA 在核糖体上通过携带 L-氨基酸的转移 RNA 而被翻译。替代的方法是依靠专一性的细菌酶的作用，直接将 D-氨基酸连结在一起。个别情况下，D-氨基酸是原核生物和真核生物核糖体合成蛋白质的组成部分，这些 D-氨基酸残基是翻译后形成的，或许是先前存在的 L-氨基酸残基通过酶的转化而形成的。

C. 生物活性氨基酸

20 种基本氨基酸经历了奇妙的众多化学转化，变成其他的氨基酸和相关的化合物，成为细

胞合成和降解的一部分。少数情况下,氨基酸代谢的中间体具有直接作为20种基本氨基酸的前体或降解产物以外的功能。此外,许多氨基酸并不作为合成多肽的残基,而具有独自的功能。我们知道有些有机体利用某些氨基酸,以氨基的形式来转运氮(节21-2B)。氨基酸亦可作为代谢的燃料被氧化供能(节20-4)。此外,氨基酸及其衍生物经常作为化学信使在细胞通讯中起作用(图4-16)。例如,甘氨酸、**γ-氨基丁酸**(GABA;谷氨酸脱羧的产物)、**多巴胺**(酪氨酸衍生物)都是**神经递质**(neurotransmitter),是由神经细胞释放用于改变邻近神经细胞行为的物质。**组胺**(histamine;组氨酸的脱羧产物)是一种变态反应的强有力的局部介体。**甲状腺素**(thyroxine,另一种酪氨酸的衍生物)是一种通常刺激脊椎动物新陈代谢的含碘的甲状腺激素。

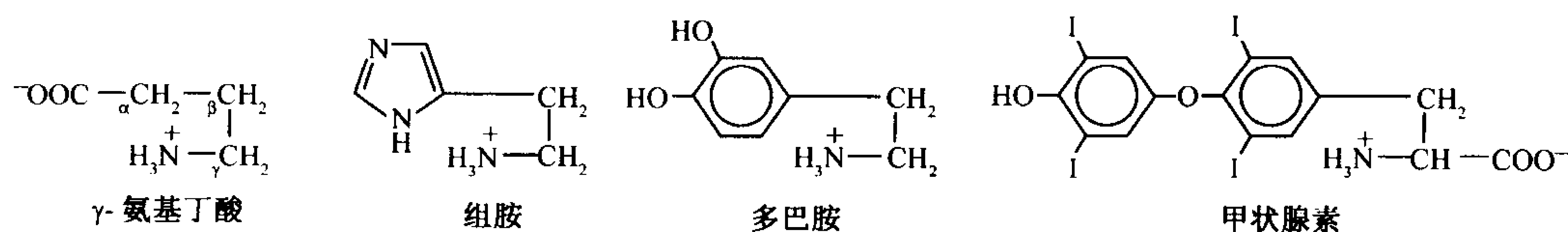


图4-16 一些生物活性氨基酸衍生物

母体氨基酸的保留部分为黑色和红色,添加的基团为蓝色。

利用氨基酸发挥功能而不只是用以合成蛋白质,是大自然利用现成的材料达到新目的一个例子。在各种植物和真菌中,已发现大约有250种不同的氨基酸,其中大部分的生物学作用仍不清楚,但是它们对其他有机体有毒性这一事实暗示它们具有保护性功能。

小 结

1. 中性pH时,氨基酸的氨基质子化而羧基离子化。
2. 蛋白质是氨基酸通过肽键连接的聚合物。
3. 20种基本氨基酸能被分类成非极性的(Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Met、Pro、Phe、Trp),极性不带电荷的(Ser、Thr、Asn、Gln、Tyr、Cys)和极性带电荷的(Lys、Arg、His、Asp、Glu)。
4. 氨基酸可电离基团的pK值受邻近基团的影响,当该氨基酸作为多肽的一部分时,其pK值会有所改变。
5. 氨基酸是手性分子,在蛋白质中仅存在L-氨基酸(某些细菌肽含有D-氨基酸)。
6. 氨基酸掺入多肽后还能被共价修饰。
7. 个别氨基酸和其衍生物有各种不同的生理功能。

参考文献

Barrett, G.C. (Ed.), *Chemistry and Biochemistry of Amino Acids,* Chapman & Hall (1985). [Includes structures of the common amino acids along with a discussion of their chemical reactivities and information on analytical properties.]

Davies, J.S. (Ed.), *Amino Acids and Peptides,* Chapman & Hall (1985). [A sourcebook on amino acids.]

Jakubke, H.-D. and Jeschkeit, H., *Amino Acids, Peptides and Proteins,* translated into English by Cotterrell, G.P., Wiley (1977).

Lamzin, V.S., Dauter, Z., and Wilson, K.S., How nature deals with stereoisomers, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5**, 830–836 (1995). [Discusses proteins synthesized from D-amino acids.]

Solomons, T.W.G., *Organic Chemistry* (6th ed.), Chapter 5, Wiley (1996). [A discussion of chirality. Most other organic chemistry textbooks contain similar material.]

关　键　词

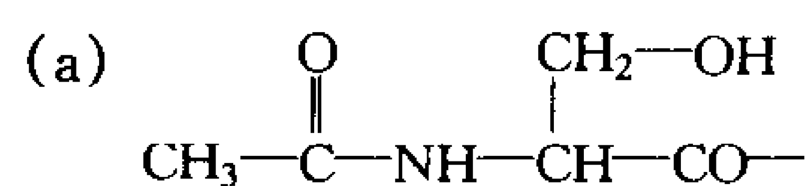
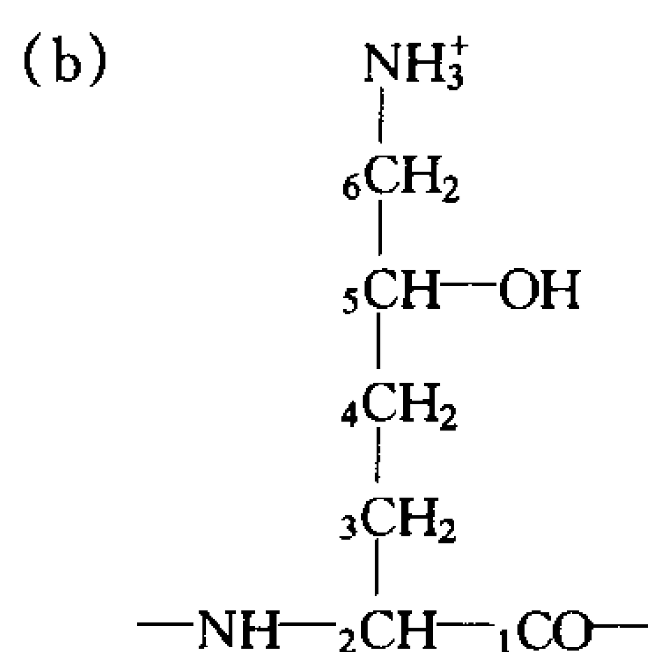
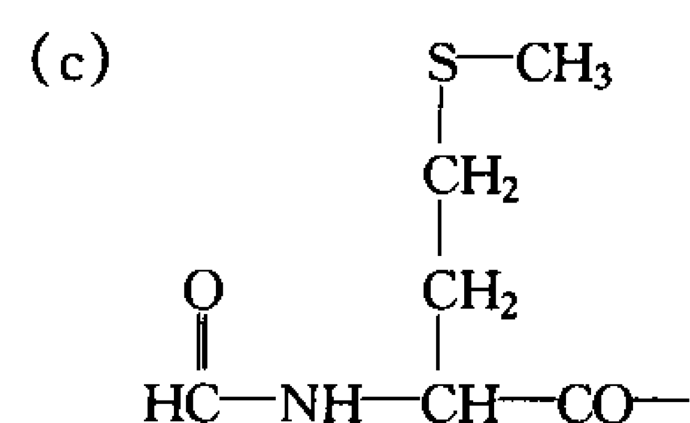
蛋白质　protein
三肽　tripeptide
α-氨基酸　α-amino acid
寡肽　oligopeptide
α-碳　α carbon
多肽　polypeptide
R 基团　R group
残基　residue
兼性离子　zwitterion
N 末端　N-terminus
肽键　peptide bond
C 末端　C-terminus
二肽　dipeptide
等电点　p*I*
光学活性　optical activity
右旋的　dextrorotatory
手性中心　chiral center
Fischer 投影　Fischer projection
对映异构体　enantiomers
外消旋混合物　racemic mixture
绝对构型　absolute configuration
肽酶　peptidase
Fischer 规则　Fischer convention
神经递质　neurotransmitter
立体异构体　stereoisomer
左旋的　leverotatory

学习思考题

1. 画出 20 种基本氨基酸的结构，并给出它们的单字母和三字母缩写。
2. 按极性、结构功能基团类型和酸-碱性质，将 20 种基本氨基酸进行分类。
3. 描述有可电离侧链氨基酸的电离状态。
4. 说明 Fischer 规则如何描述一个手性分子的绝对构型。
5. 列举氨基酸在蛋白质中的若干共价修饰。

练　习　题

1. 写出相互只有一个亚甲基差别的各氨基酸。
2. 写出天冬酰胺中的氢键供体和受体基团。
3. 画出 pH7.0 时的二肽 Asp-His。
4. 计算含 Ala, Gly, His, Lys 和 Val 各一个残基的五肽的可能数目。
5. 写出 Asp 主要的净电荷数：(a)pH1.0，(b)pH3.0，(c)pH6.0 和(d)pH11.0。
6. 计算(a)Ala，(b)His 和(c)Glu 的 pI 值。
7. 画出苏氨酸的四种立体异构体。
8. 甘氨酸 α-碳的二个氢原子可被视为是原手性的，因为它们其中的一个被别的基团所取代，α-碳才变成手性的。画出甘氨酸的 Fischer 投影并指出哪一个 H 被 CH_3 取代生成 D-丙氨酸。
9. 应用 RS 系统，描述异亮氨酸(如表 4-1 所示)。
10. 写出下列化合物是从什么氨基酸合成而来：

(a)  (b)  (c) 

11. 画出 ATLDAK 肽。(a)计算其 p*I* 近似值。(b)pH7.0 时的净电荷是多少?(该问题由 Kathleen Cornely, Providence College 提供)

12. 胰岛素由 A、B 两条肽链组成。来源于不同生物体的胰岛素已被分离和测序,人和鸭的胰岛素除 6 个氨基酸残基外具有相同的氨基酸序列,如下所示,问人胰岛素的 pI 比鸭胰岛素的 pI 是低还是高?

	氨基酸残基					
	A8	A9	A10	B1	B2	B27
人	Thr	Ser	Ile	Phe	Val	Thr
鸭	Glu	Asn	Pro	Ala	Ala	Ser

(该问题由 Kathleen Cornely, Providence College 提供。)

(南京大学　张洪祖　译)

第 5 章　蛋白质:一级结构



蛋白质的结构和功能的巨大差异,反映了蛋白质中氨基酸序列的巨大变化——蛋白质中可能的氨基酸序列的数目比天空中的繁星还要多得多。如何在实验室里确定蛋白质的这种多样性并揭示蛋白质之间的进化关系呢?(引自 John Chumack)

94

在生命过程中蛋白质是活动的中心。几乎在所有细胞新陈代谢过程中所包含的分子的变化,都有蛋白质催化剂参于。蛋白质也能起调控作用,控制并稳定细胞内外的环境,以及传递信息给其他细胞组分。另外,蛋白质也是细胞重要的结构组分。一份完整的已知蛋白质功能的列表会包括千万个条目,包括转运其他分子和产生动力及电化学能。然而这样一个表并不能包括那些成千上万种功能还未完全确定或者在许多情况下其功能仍是一无所知的蛋白质。

解析蛋白质功能的关键之一是去了解它的结构。像其他主要的生物大分子——核酸(节 3-2)和多糖(节 8-2)一样,蛋白质是较小单元的聚合物。但是与许多核酸不同,蛋白质没有统一的、有规律的结构。就某一方面来说,这是因为组成蛋白质的 20 种氨基酸残基在理化性质上具有显著的差异(节 4-1C)。通过研究这些氨基酸分子如何连接在一起,我们可以尽可能多地了解蛋白质的理化性质并且最终明白它们在生物体中的作用机制。

要研究蛋白质的多样性,就要求有完善的制备和分析技术。在这一章中,我们介绍蛋白质的纯化方法。我们也将讨论氨基酸测序,以及由此提供的关于蛋白质功能和进化的信息。在第 6 章中,我们将研究蛋白质的三维结构。

1. 多肽多样性

与所有聚合分子一样,从它的组织结构来说,蛋白质可以被描述为一级结构、二级结构、三级结构和四级结构。***蛋白质的一级结构(primary structure)就是多肽链的氨基酸顺序***,如果蛋白质是由两条以上肽链组成时,则是所有肽链的氨基酸顺序。例如图 5-1 所示的氨基酸序列,每个残基之间通过肽键(图 4-3)相连。蛋白质的高级结构 (二级、三级和四级),涉及到多肽链折叠成三维形状,这些我们将在下一章中描述。

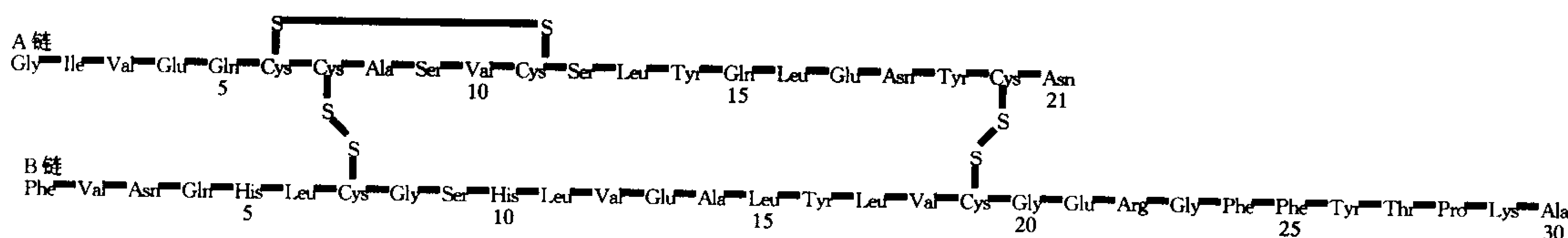


图 5-1 牛胰岛素的一级结构

注意链间和链内二硫键的连接。

蛋白质在机体内通过氨基酸的逐步聚合而合成,其顺序是由基因上的核苷酸序列所确定。在一个线性多聚物(DNA)和另一个线性多聚物(多肽)之间完全的对应关系展示了生命系统的精确的简明性,并且使我们能从一种多聚物的信息,推测另一个的信息。

理论上多肽的数目没有限制

95

在一条多肽链中,每个位置对氨基酸残基都有 20 种不同的选择,这也就很容易理解大量的不同蛋白质是可能存在的。对于有 n 个残基的蛋白质,具有 20^n 个可能的序列。一个小分子蛋白的一条单链上有 100 个残基,有 $20^{100} \approx 1.27 \times 10^{130}$种排列可能。这个数字远比宇宙中现有统计的 9×10^{78}个原子数目还要多。显而易见,蛋白质只演变出理论上极小的一部分,而这一部分就已经展示了不可估算的天文数目不同的多肽(在实验室中甚至可以产生更多的多肽。见框 5-1)。

框 5-1　生物化学焦点

组合肽文库

就肽的多样性而言，虽然自然界已经停止，但在实验室中又被科学家们利用起来。20 世纪 80 年代，一个开创性的工作就是，Mario Geysen 展示化学合成大量的寡肽是可能的，这些寡肽的残基在选择的位点上系统地变化。例如：一个合成的六肽具有 *X-X*-A-B-*X-X* 序列，其中 *X* 代表 20 种氨基酸中任何一种，而 A 和 B 是已知的。Geysen 的关于六肽合成的方法使原先不可能的工作（合成所有可能的序列就有 20^6，即 64 000 000 种多肽）成为可操作性的工作，（合成并检测了 20^2 即 400 种）。这被称为**肽文库**（peptide library），它在发展新药和蛋白质功能探针方面具有重要价值。

这 400 个六肽的文库可以通过它们结合其他分子（Geysen 原始实验中称之为抗体）的能力、或者产生的生物效应快速地被筛选。一个"确定的"*X-X*-A-B-*X-X* 序列，又成为合成新的一组 400 种六肽，序列为 *X*-A-Y-Z-B-*X* 的起始点，其中 Y 和 Z 现在代表两种选定的不变的残基（这种方法并不局限于六肽）。

具有高生物活性的扩展序列能通过不断的合成和筛选构建。在某种意义上讲，化学家利用了指导进化的原理，只是他们用了更少的时间。多肽文库会包括一些新的肽链，而这些肽在自然界是不存在的，或者说是不可能从天然资源中寻找和纯化的。

运用相似的原理，寡核苷酸文库已经在体外合成并且测定了它们结合其他分子的能力和催化反应的能力。如果合成的寡核苷酸被整合到表达载体中，则相应的寡肽能在合适的宿主中合成，并且可以表现出在体内期望的生物学活性。寡核苷酸文库还有另外的优点，一个寡核苷酸的单拷贝可以通过 PCR 仪扩增并且能被测序。

实际上多肽在大小和组成上受到某些限制

一般来说，蛋白质至少包含 40 个残基左右，比这小的多肽被简称为**肽**（peptide）。已知最大的多肽链是具有 26 926 个残基的**肌联蛋白**（titin），其分子质量为 2990kDa，它辅助肌肉纤维排列成重复单位。然而，*绝大多数肽链的长度在 100～1000 个残基之间*（表 5-1）。**多亚基**（multisubunit）蛋白包括几个相同和（或）不同的肽链，单条肽链被称为**亚基**（subunit）。某些蛋白质以单一多肽链被合成，但最终被分解成两条或更多的链，而它们仍然连在一起；**胰岛素**（insulin）就是这样一种蛋白（图 5-1）。

大多数多肽的大小范围或许反映了一些生物化学过程的最优选择。

1）40 个残基是多肽链折叠成具有独立且稳定的形状，并能执行特殊功能的蛋白的最小数目。

2）具有数千残基的多肽可能已达到蛋白质有效合成的最大限度。多肽链越长（它对应的 mRNA 和基因也越长），转录和翻译过程中出错的可能性就越大。

除了在大小上的制约外，多肽在氨基酸组成上受到更严格的限制。这 20 种基本的氨基酸在蛋白质中出现的频率并不相同（表 4-1 列出每种氨基酸残基出现的频率）。举例来说，蛋白质中最常见的残基是 Leu、Ala、Gly、Ser、Val 和 Glu；稀有的是 Trp、Cys、Met 和 His。由于每个氨基酸残基都有各自独特的理化特征，因此它在蛋白质中特定位点的出现将会影响这种蛋白质的性质。特别是，正如我们将会看到的，多肽链折叠成三维形状是分子内多种氨基酸残基之间作用力的结果。一般来说，蛋白质的疏水残基聚集在其内部，不与水相接触，而它的亲水侧链则占据了蛋白质的表面。

96

表 5-1 部分蛋白质组成

蛋白质	氨基酸残基数	亚基数	分子质量/Da
蛋白酶抑制剂Ⅲ(甜瓜)	30	1	3409
细胞色素 *c*(人)	104	1	13 000
核糖核酸酶 H(大肠杆菌)	155	1	17 600
γ-干扰素(兔)	288	2	34 200
分支酸变位酶(枯草杆菌)	381	3	43 500
磷酸丙糖异构酶(大肠杆菌)	510	2	56 400
血红蛋白(人)	574	4	64 500
RNA 聚合酶(T7 噬菌体)	883	1	98 000
二磷酸核苷激酶(真菌盘基网柄菌)	930	6	102 000
丙酮酸脱羧酶(酵母菌)	2252	4	250 000
谷氨酰胺合成酶(大肠杆菌)	5616	12	600 000
肌联蛋白(人)	26 926	1	2 990 000

本质上,一个蛋白质的特征与其说决定于它的氨基酸百分组成,不如说取决于它的氨基酸序列。这与"kitchen"和"thicken"是完全不同的两个单词的道理是一样的。另外,许多蛋白质不仅仅只由氨基酸组成。它们可以与金属离子,例如 Zn^{2+} 和 Ca^{2+},形成络合物,它们可以共价或非共价地结合某些小的有机分子,并且它们可以通过翻译后被磷酸盐和糖基基团共价修饰。

2. 蛋白质纯化

幸运的是,多肽的大小和化学组分的不同使得很容易设计出把蛋白质相互分离以及与其他生物分子分开的方法。纯化是研究大分子物质必要的步骤,但它未必容易。典型地,一种占组织净重小于 0.1%的组分,必须纯化至约 98%的纯度。大多数合成化学家,对这个重要的纯化问题可能考虑得过于困难了!下面各部分将简述一些最常见的纯化和鉴定蛋白的技术。这些技术中的大部分有时稍加修改便能应用于核酸和其他类型的生物分子。

97

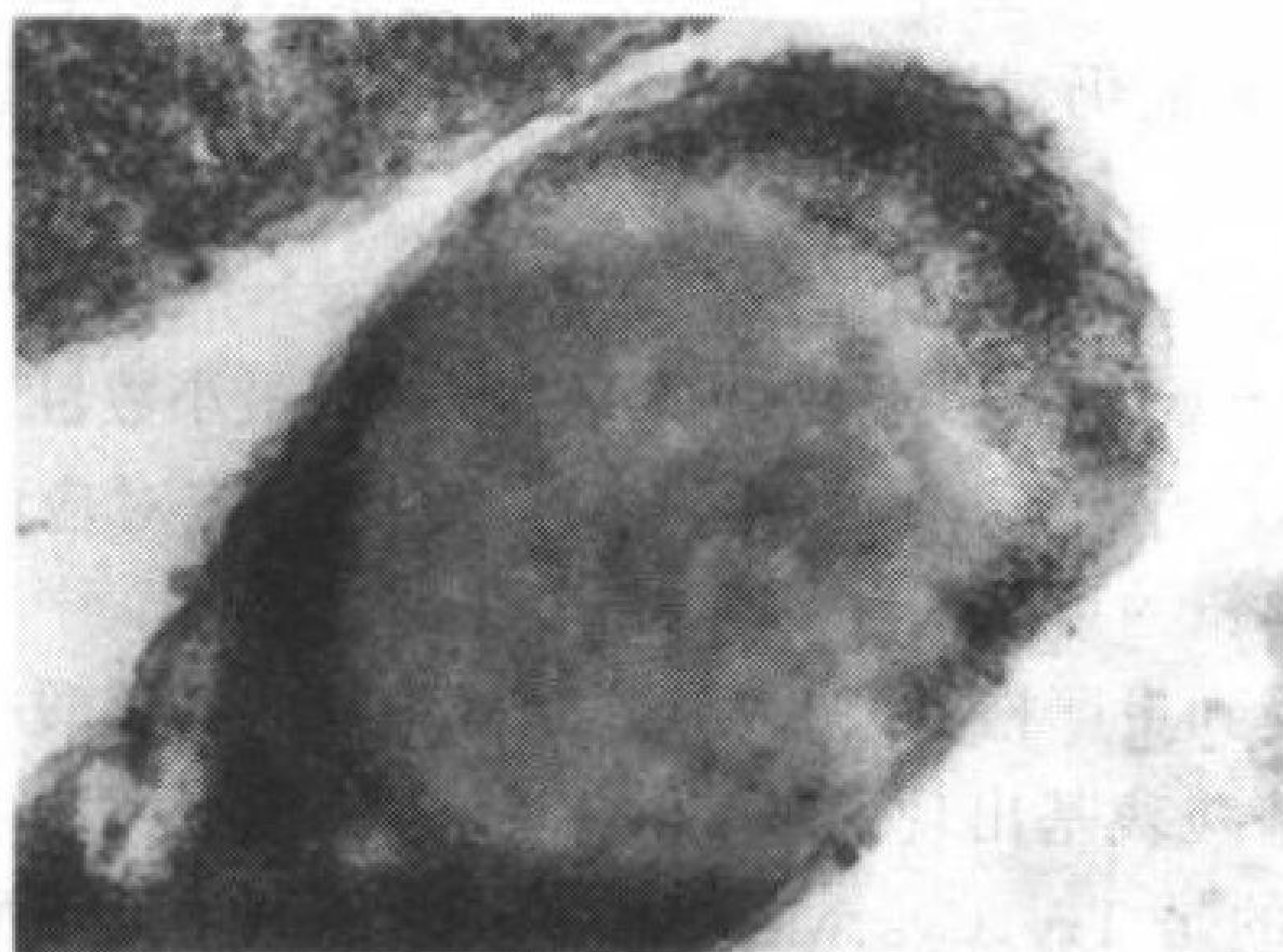


图 5-2 包含体

基因工程改造的生物体可以产生大量外源蛋白,这些蛋白被隔离在包含体中。这张电镜照片展示了 *E.coli* 细胞内的凝乳酶原的包含体。(引自日本 Nikon 大学 Reruhik Beppu)

A. 纯化蛋白质的一般方法

纯化微量蛋白的任务曾经十分困难,所以许多早期鉴定的蛋白能被研究,部分原因是因为含量高并且容易分离。例如,占血红细胞重量 1/3 的**血红蛋白**(hemoglobin),在历史上是最广泛被研究的蛋白之一。大多数能调节基本代谢过程或者与遗传信息的表达和传递有关的酶,在所有生命体中都普遍存在。正因为如此,一种特定的蛋白常常可以通过方便的来源获得,例如,人工驯养动物的组织或者容

易获得的微生物,如大肠杆菌和酿酒酵母。

分子克隆技术(节3-5)的发展,使得从母体中分离几乎所有编码蛋白的基因成为可能,特别是可加以改造(基因工程),然后在微生物体内进行高效表达。事实上,克隆蛋白可以构成微生物体内细胞总蛋白的40%(图5-2)。这种高效表达所获得的克隆蛋白比从母体中分离要容易得多(在母体中这种蛋白少到几乎为零)。

分离蛋白或其他生物分子的第一步是将其从细胞中取出,溶于溶液中。许多细胞需要通过某种机械破碎来释放内容物。大多数破碎细胞的程序是通过挤压或研磨,然后离心或过滤除去大的不溶性颗粒。如果目的蛋白与脂膜紧密相连,可用去污剂和有机溶剂溶解脂膜,而后获得目的蛋白。

保持蛋白质稳定

一旦蛋白从天然环境中分离出来,它就暴露在许多因素中,这些因素能不可逆地破坏蛋白。在蛋白质纯化过程中,必须小心控制这些影响因素。以下几点应该加以注意:

1) pH值。生物物质通常在适当pH值范围内的缓冲液中被溶解,这个范围使物质处于稳定状态(节2-2C将描述缓冲液)。不适宜的pH值会导致它们的**变性**(denaturation,结构破坏),而不是发生化学降解。
2) 温度。蛋白质的热稳定性是不同的。一些蛋白在高温下,或者是在仅仅比它们的天然环境高几度的情况下,就能发生变性。因此纯化蛋白质通常在0℃左右的温度下进行。
3) 降解酶的存在。当组织被破坏并释放出目的分子后,降解酶也同时被释放。这些酶包括**核酸酶**(nuclease,降解核酸的酶)和**蛋白酶**(protease,切割蛋白质肽键的酶)。调节pH值或温度到一定值(但不能对目的蛋白有不利作用),通过使这些酶失活而抑制它们,或者添加可以特异阻断它们作用的化合物。
4) 表面吸附作用。许多蛋白质由于与气-液界面或玻璃和塑料的表面相接触而发生变性。因此,蛋白溶液要经过处理,减少泡沫,并且保持在相对浓缩的状态下。
5) 长期贮存。要保持一个已纯化蛋白的稳定,不仅要注意上面所有列举的因素,而且还要防止缓慢氧化和微生物污染等过程。蛋白溶液有时贮存在氮气中或氩气中(比贮存在空气中好),在-70℃或-196℃(液氮的温度)条件下冷冻保存。

98

蛋白质测定

纯化一种物质需要一些定量检测的方法。因此,对于目的蛋白的**测定**(assay)必须设计出专一性的实验,高灵敏度,且易于操作(尤其要求这个实验在每步纯化后都可以重复操作)。

蛋白质测定方法中,最直接的是测定酶蛋白的方法,它可利用酶催化反应生成易于测定的产物,因为*产物生成的速度与酶的数量是成比例的*。用颜色或荧光标记的物质已被开发用于这种目的。如果没有这样的物质适合于反应中的酶,那么可以把酶促反应的产物标记为易于定量分析的物质,通过另一种酶进行催化。这就是所谓的**偶联酶促反应**(coupled enzymatic reaction)。不是酶的蛋白质可以结合特异物质产生可观测到的生物学效应而被检测。

免疫化学反应是检测技术中灵敏度最高的分析技术。**免疫测定**(immunoassay)使用的是**抗体**(antibody),即动物自身免疫系统对外源物质[**抗原**(antigen)]的侵入作出反应的产物。抗体来自于被免疫动物的血清或者来自单克隆抗体细胞,它能和起始蛋白抗原特异地结合(有关抗体将

在节 7-4 作详细讨论)。

通过抗原抗体特异结合很容易检测到复杂混合物中的蛋白质。其中一种技术是**放射免疫测定法**(radio immunoassay, RIA),蛋白质可以通过与带有放射性标记的标准蛋白竞争结合抗体的程度被间接检测。另一种技术是**酶联免疫吸附测定**(enzyme-linked imunosorbent assay, ELISA),它有很多不同的变化,图 5-3 中示出了其中的一种测定过程。

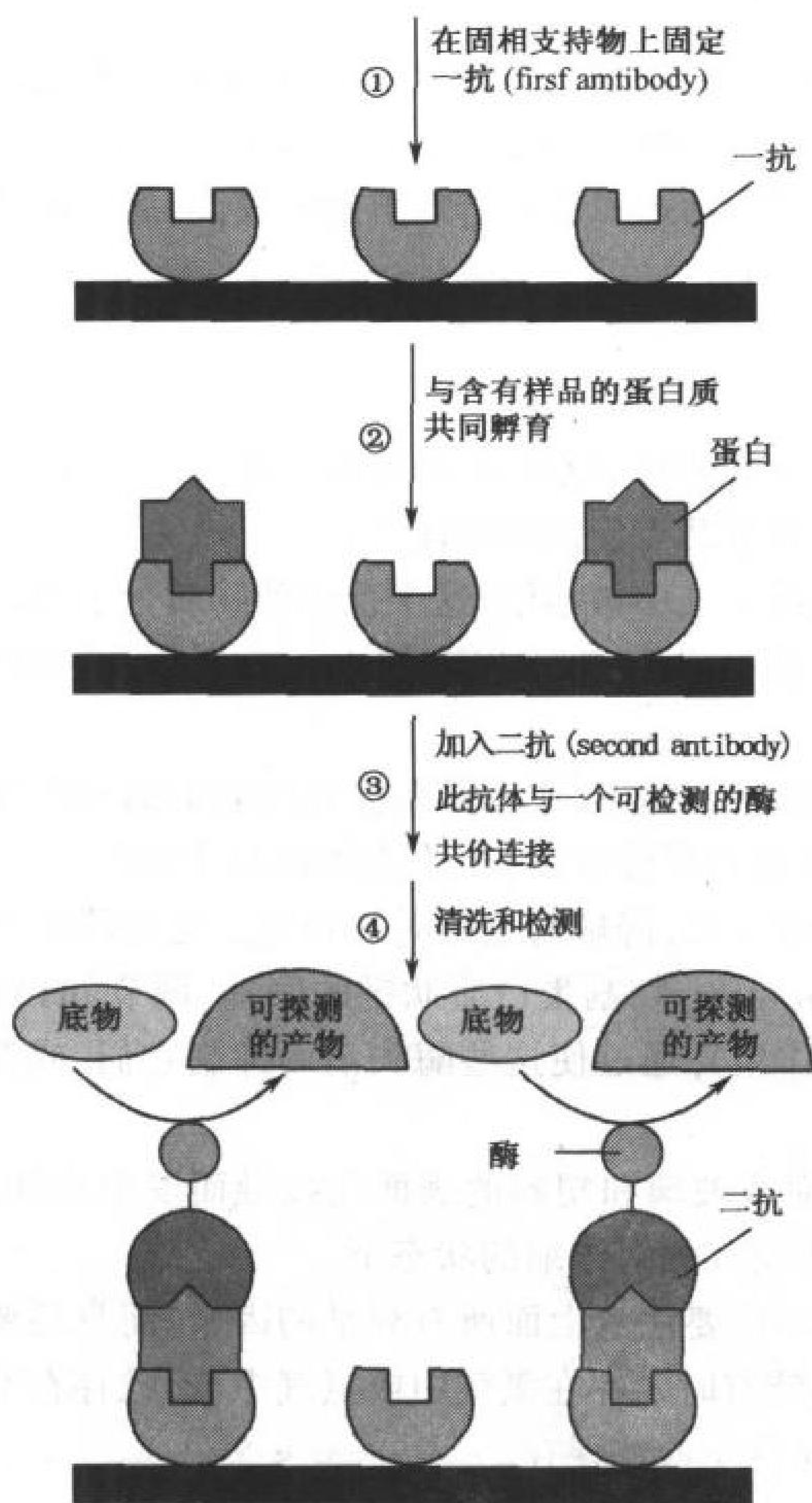


图 5-3 酶联免疫吸附测定(ELISA)

①与目的蛋白对应的抗体被固定在惰性固相支持物上,如聚苯乙烯。②将要分析的蛋白溶液加到包被抗体的表面。抗体与目的蛋白结合,而其他蛋白将被洗掉。③抗原抗体复合物中的抗原再和二抗反应,二抗连接有一个酶。④结合上的二抗-酶复合物,可以测量酶活。有多少底物转变为产物,原溶液中就有多少目的蛋白。

分离技术

通过**分级分离程序**(fractionation procedure)来纯化蛋白。在一系列步骤中,利用目的蛋白不同的理化特性把它与其他物质逐步地分离开来。蛋白在纯化过程中的损失不必减至最小程度,但必须有选择性地去除混合物中的其他成分,得到单一的目的蛋白。

客观上,证明一种物质的纯度或许是不可能的。事实上,纯度就是通过使用任何可能的分析方法检测样品,证实其中组分是单一的。纯化的标准不断地由于新的分离方法的建立而改变。经验告诉我们,当用新的分离技术检测一种被认为是'纯'物质的时候,结果常常是,这个物质并不是单一的。

蛋白纯化被认为是科学中的艺术,每一步都有多种可选择的方法。在试错法(trial-and-error)中,已知目的蛋白的特性可以简化分离程序的选择。在各种分离程序中应用的蛋白质和其他生物分子的特性有:溶解度、离子带电量、分子大小、与其他生物分子的特异结合。我们所讨论的一些蛋白分离程序以及它们所依赖的蛋白特性如下:

特性	程序
带电量	离子交换层析
	电泳
极性	疏水层析
大小	凝胶过滤层析
	SDS-PAGE
	超速离心
特异性结合	亲和层析

B. 蛋白质的溶解度

因为蛋白质含有许多带电基团,所以它的溶解度依赖于盐浓度、溶液极性、pH 值和温度。可以调节这些变量中的一些或全部,选择性地沉淀一些蛋白,而其他蛋白仍处在溶解状态。

低离子浓度下，增加盐浓度可以增加蛋白质的溶解度，此现象称为**盐溶**(salting in)。添加的离子屏蔽了蛋白质的带电基团，因此减弱了蛋白质分子之间的吸引力(这个作用力可以引起蛋白质聚集和沉淀)。然而，盐量继续增加，蛋白质溶解度会重新变小，这是**盐析**(salting out)效应。此效应主要是由于新增的盐离子和溶液中其他可溶性物质(例如蛋白分子)争夺溶剂分子而造成的。在高盐浓度下，大量添加的盐离子呈溶解状态，原溶液中供溶解其他物质包括蛋白质的溶剂体积将显著减少。

因为不同的蛋白质能在不同的盐浓度下沉淀析出，所以盐析是蛋白质纯化最常用的一种方法。调节蛋白质混和溶液中的盐浓度到恰恰低于目的蛋白质的沉淀点，可以从溶液中除去许多不想要的蛋白质(图 5-4)。然后，通过过滤或离心除去被沉淀的蛋白质，将剩余溶液的盐浓度升高便沉淀出目的蛋白。这个程序可以使大量蛋白质得到显著的纯化和浓缩。

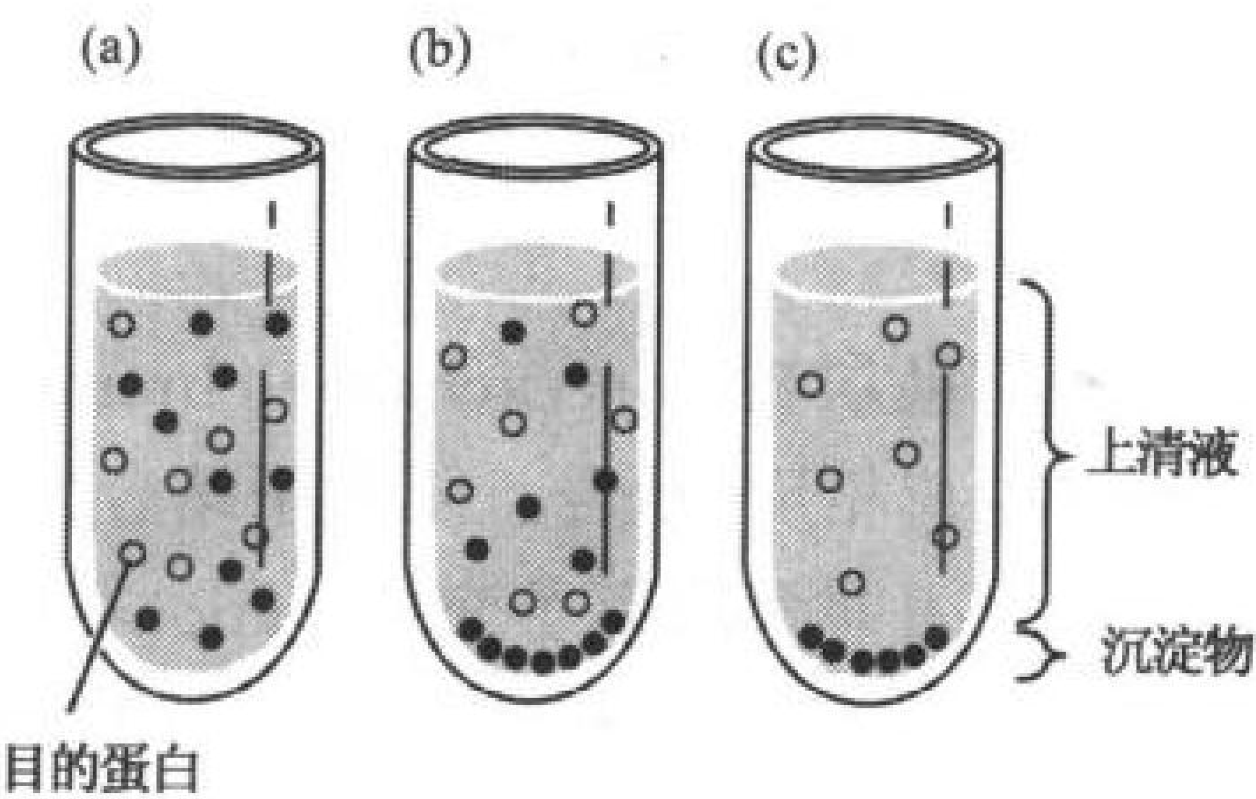


图 5-4 盐析分离

(a)将所选择的盐，通常是硫酸铵，加入到大分子的溶液中，使其浓度恰恰达到目的蛋白的沉淀点以下。(b)离心去掉不需要的沉淀蛋白(红球所示)，在上清液中增加盐浓度，盐析出目的蛋白(绿球所示)。(c)第二次离心后，收集沉淀获得蛋白，丢弃上清。

$(NH_4)_2SO_4$ 是盐析过程中最常用的盐，因为它的高溶解度(0℃时，可以达到 $3.9 mol \cdot L^{-1}$)可使要纯化的溶液有很高的离子强度。pH 值可以调到接近目的蛋白的等电点(pI)，可使它的净电荷为零，这时蛋白的溶解度最小。表 5-2 中列举了部分蛋白质的 pI 值。

表 5-2　几种常见蛋白的等电点

蛋白质	pI	蛋白质	pI
胃蛋白酶	<1.0	肌红蛋白(马)	7.0
卵清蛋白(鸡)	4.6	血红蛋白(人)	7.1
血清蛋白(人)	4.9	核糖核酸酶 A(牛)	9.4
原肌球蛋白	5.1	细胞色素 c(马)	10.6
胰岛素(牛)	5.4	组蛋白(牛)	10.8
纤维蛋白原(人)	5.8	溶菌酶(鸡)	11.0
γ球蛋白(人)	6.6	鲑精蛋白(鲑鱼)	12.1
胶原蛋白	6.6		

C. 层析法

1903 年，Mikhail Tswett 以固体吸附物为介质分离出溶解的植物色素，发现了**层析**(chromatography)过程。在大多数现代层析过程中，欲分离的混合物溶解于液体[**流动相**(mobile phase)]中，然后渗滤通过一个装有多孔的固体基质[**固定相**(stationary phase)]的柱子。当溶质流经柱子时，它们与固定相相互作用而被减速。不同溶质的性质不同，因而所受的作用力大小也不同，导致迁移率不同。如果柱子足够长，迁移率不同的物质将被分开。层析是非常有用的纯化蛋白质的方法，根据蛋白质与固定相相互作用的性质可将它分类。

100

一种早期的层析技术是使用条状滤纸作为固定相，因此被称为**纸层析**(paper chromatography)。现代的柱层析则使用纤维素、琼脂糖、葡聚糖(都为碳氢多聚物)的衍生物，或者是合成物质，比如聚丙烯酰胺、硅胶颗粒等。**高效液相层析**(high-performance liquid chromatography, HPLC)使用精确加样的自动系统，在高压[高达 5000psi(磅力每平方英寸，$1psi = 6.89 \times 10^3 Pa$)]下控制流速，层析基质采用人工制作的直径为 3～300μm、用单一层析物质包裹的玻璃和塑料珠，并且能即时进行样品检测。这将大大提高速度、分辨率及分离的可重复性，这些优点对于重复多次的层析分离、或用于分析而不是制备的层析技术，是尤其需要的。

离子交换层析

在**离子交换层析**(ion exchange chromatography)中，带电分子与固定相上的带电基团(与带电分子所带电荷相反)结合。阴离子结合阳离子基团即为**阴离子交换**(anion exchanger)，阳离子结合阴离子基团即为**阳离子交换**(cation exchanger)。常用的阴离子交换剂是基质上含有**二乙基氨基乙基**(diethylaminoethyl, DEAE)，而常用的阳离子交换剂则为**羧甲基团**(carboxy methyl, CM)连接于基质上。

DEAE：基质—CH_2—CH_2—$NH(CH_2CH_3)_2^+$

CM：基质—CH_2—COO^-

以琼脂糖和纤维素是蛋白质离子交换层析中最常用的基质物质。

蛋白质和其他**聚电解质**(polyelectrolyte)(聚离子多聚物)，既带有正电荷，又带负电荷，可以

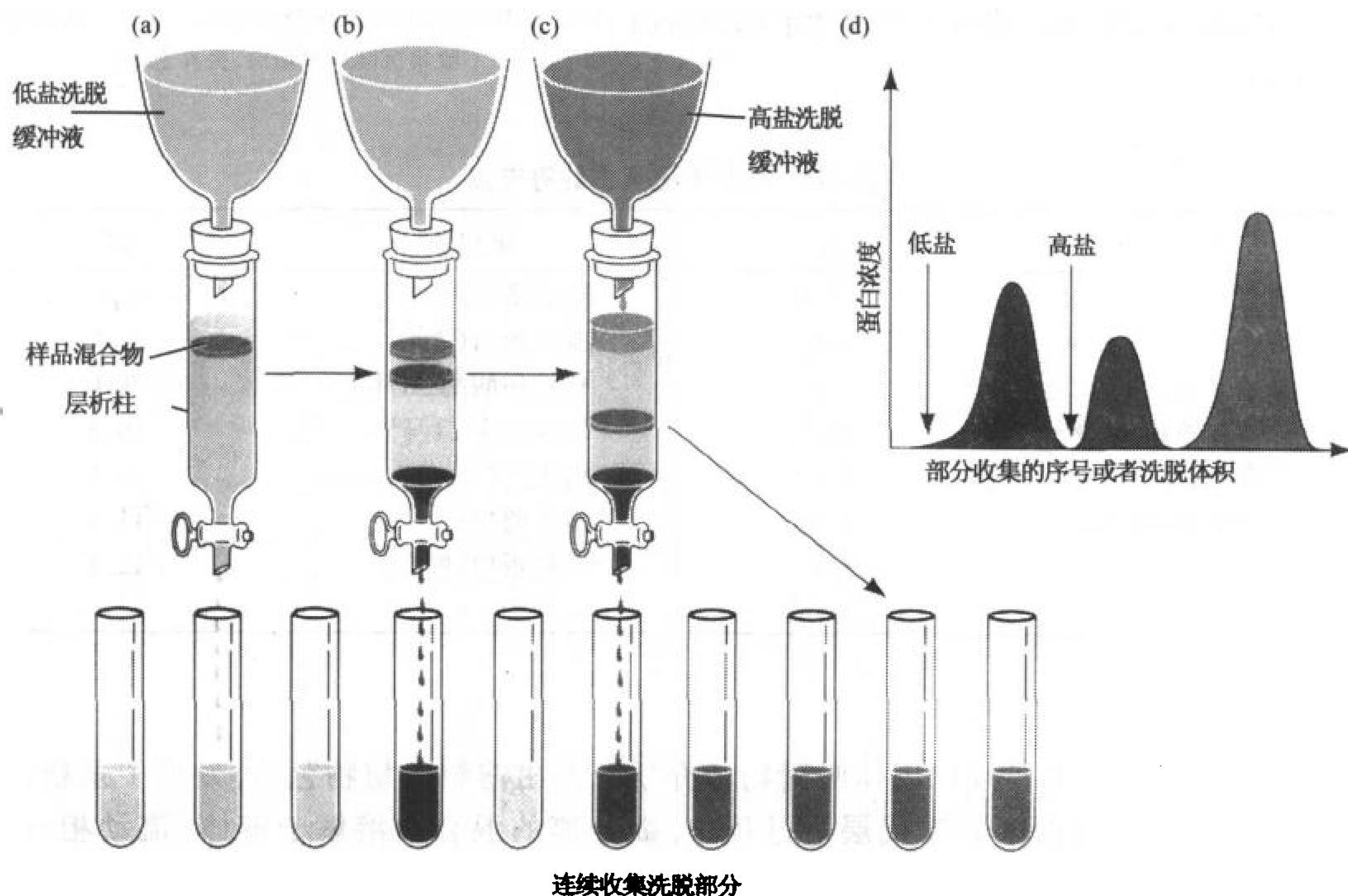


图 5-5 离子交换层析

离子交换剂为棕黄色部分，蛋白质用彩色条带标示。(a)用少量缓冲液将蛋白质溶解，然后把溶液加到层析柱基质的顶端。(b)在洗脱过程中，蛋白根据吸附力的不同而被分成不连续的条带。此图中，第一种蛋白(红色)通过柱子被分离出来，而另一种蛋白仍在柱顶附近。(c)增大洗脱液中的盐浓度，将剩余蛋白洗脱下来。(d)混合蛋白的洗脱曲线图。

通过改变它们的净电荷,使其既可以和阳离子交换剂结合,又可以和阴离子交换剂结合。特定蛋白与离子交换剂的吸附取决于溶液中其他与其竞争结合离子交换剂的离子,以及溶液的 pH 值。溶液的 pH 值会影响到蛋白质所带的净电荷。

准备分离的蛋白质溶解在适当的 pH 值和盐浓度的缓冲液中,加样于离子交换柱上。然后用缓冲液洗脱(图 5-5)。在洗脱过程中,与交换剂亲和力低的蛋白质相对亲和力高的蛋白质在柱中的移动速度更快一些。用部分收集器来分级收集柱内流出物。与离子交换剂结合紧密的蛋白在**洗脱**(elute)时,所用**洗脱液**(eluant)要求高盐浓度或者高 pH 值,这样可以降低蛋白质的亲和力。洗脱后收集的各个部分,通过鉴定可以获得目的蛋白。

通过吸收光谱可以不断监测流出物中蛋白质的浓度。测量时波长常取在 280nm 附近,对于这个波长大多数蛋白质有吸光值。这是由于 3 种芳香烃氨基酸残基(特别是 Trp)造成的。当然,280nm 处的吸光值仅仅是对蛋白质浓度的粗略测定,因为一个蛋白质的吸光值决定它的含芳香族氨基酸残基和其他光吸收基团的含量。　101

疏水作用层析

利用层析基质和蛋白质之间的疏水作用,可以纯化蛋白质。在**疏水作用层析**(hydrophobic interaction chromatography)中,基质材料会被辛基或苯环基(疏水基团)少量地取代。蛋白质表面的非极性基团与这些疏水基团"相互作用";也就是说,两种类型的基团都会被极性溶剂排斥。洗脱液可以是逐渐降低盐浓度的缓冲液(离子强度的增大可以扩大疏水效应)、增加去污剂浓度

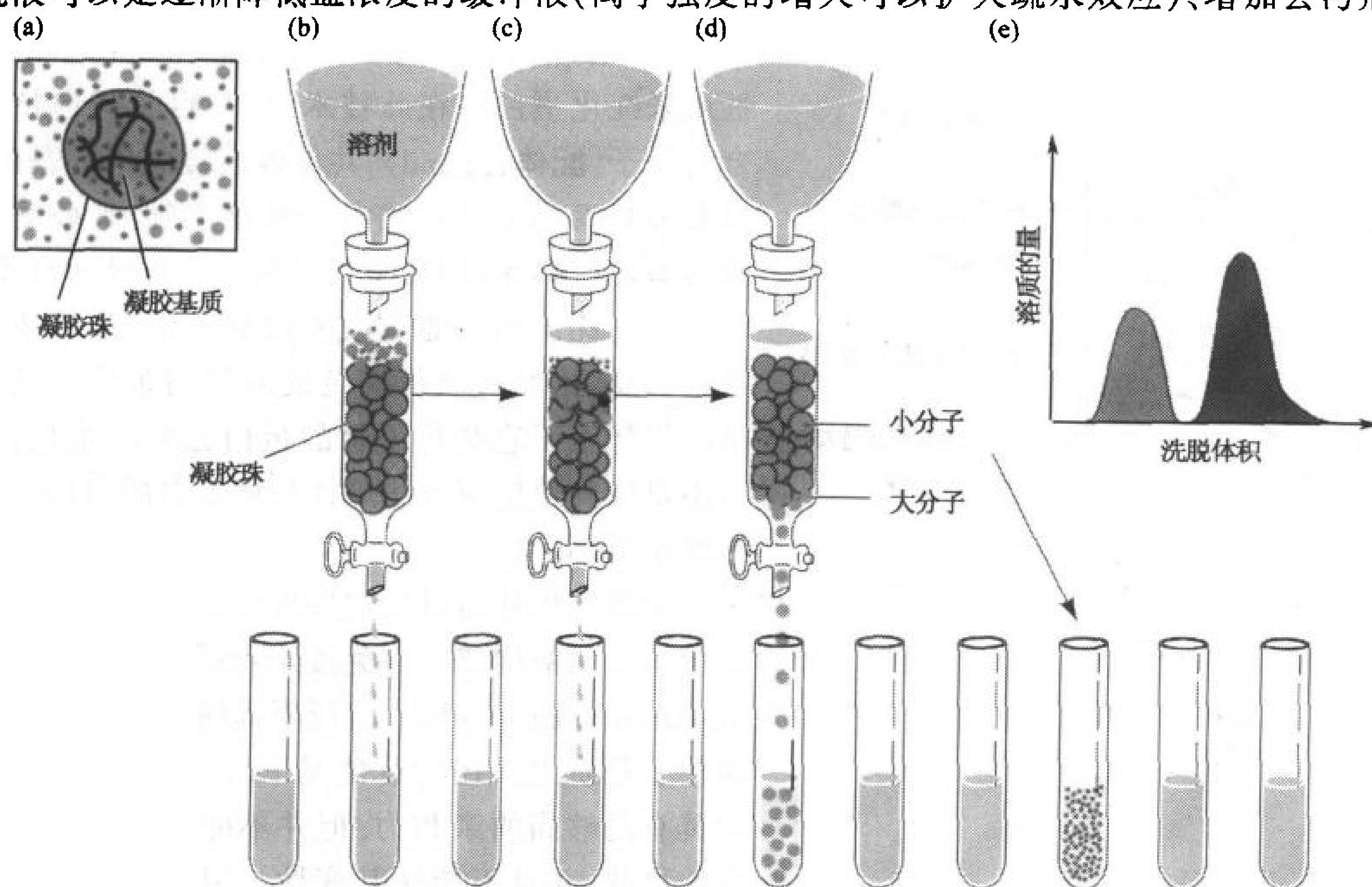


图 5-6　凝胶层析

(a)凝胶珠由凝胶基质(波浪线所示)组成,孔隙体积为内水体积。小分子(红点)可以自由进出凝胶珠上的小孔。大分子(蓝点)则不能穿过凝胶珠的孔隙。(b)样品溶液置于柱顶部(凝胶珠用棕色球形表示)。(c)可穿过凝胶珠的小分子比不能穿过凝胶珠的大分子通过柱的速度慢。(d)大分子溶液首先被洗脱出来并被收集。小分子则需要更多的洗脱体积来洗脱。(e)洗脱曲线,或层析曲线,表明两种成分被完全分开。

(可以抑制疏水相互作用)或者改变洗脱液的 pH 值。

凝胶层析

在**凝胶层析**(gel filtration chromatography)[也被称为**排阻层析**(size exclusion)或是**分子筛层析**(molecular sieve chromatography)]中,根据分子大小和形状将其分开。固定相是由带有相对狭小孔径的凝胶珠组成。凝胶聚合物之间交联的程度决定了孔径的大小。如果一种含有不同大小分子的水溶液通过包含这样"分子筛"的层析柱,大分子不能自由进出凝胶珠的小孔,因而被排阻在内水体积之外。所以大分子会比小分子(可以自由进出凝胶孔)更快地通过凝胶柱(图 5-6)。由于任何凝胶系统上的小孔大小都是有一定范围的,所以凝胶过滤只可以用来分离一定范围内的分子;几乎不能进出凝胶孔的大分子最快被洗脱(亦即只需要少量的洗脱液)下来,可以自由进出内水体积的小分子相对慢一些被洗出来。

对于特定孔隙范围内可以分离的不同大小的分子,它们分子质量的对数(假设分子形状相似)和相对洗脱体积之间存在线性关系。对于给定的凝胶系统,如果用几种已知分子大小的蛋白质作标准,那么未知蛋白的相对分子质量可以通过它的洗脱体积方便地计算出来。

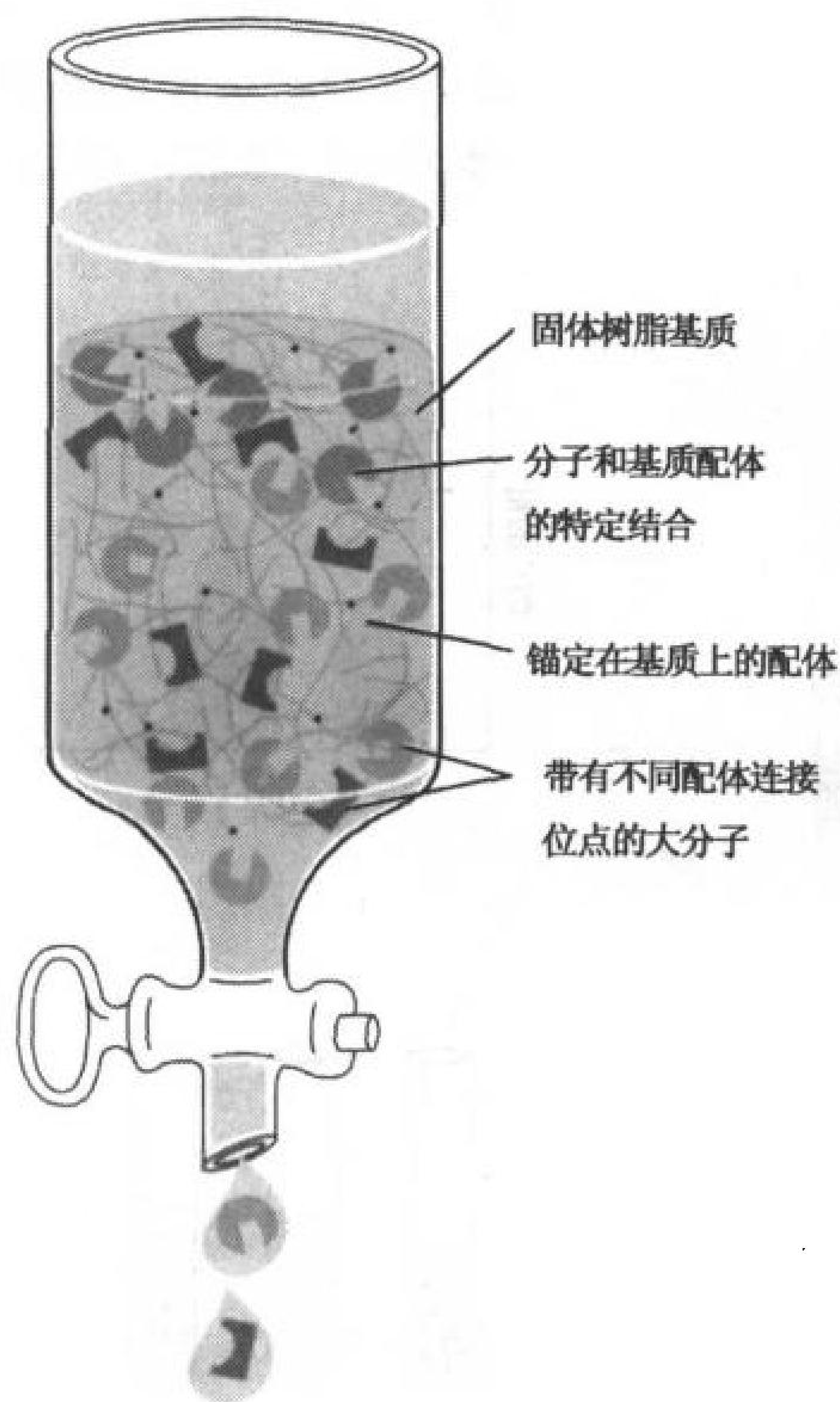


图 5-7 亲和层析

配体(黄色)和层析基质共价结合而被固定。切断的正方形、半圆和三角形表示大分子上的配体结合位点。仅有特定分子(以橘黄圆圈表示)特异性地与配体结合,而其他成分均通过柱子流出。

亲和层析

许多蛋白质都有一个重要的特性,就是它们能够非共价地与特定分子紧密结合。**亲和层析**(affinity chromatography)(图 5-7)正是利用蛋白质的这一性质来纯化蛋白。在此技术中,与目的蛋白特异结合的分子[**配体**(ligand)]共价地连接到惰性基质上。当蛋白质混合液通过这种层析物质时,目的蛋白质会与固定的配体结合,而其他的蛋白质通过柱子,被缓冲液洗脱流出。通过改变洗脱条件,从基质上释放蛋白质,从而可获得高纯度的目的蛋白。亲和层析的优势在于它利用了目的蛋白独有的生化特性,而不是像其他层析方法那样利用蛋白质间理化特性的微小差别。

亲和层析柱可以通过层析基质化学连接小分子或蛋白质而被构建。在**免疫亲和层析**(immunoaffinity chromatography)中,将所要提纯蛋白的相应抗体连接于基质上。在所有情况下,配体必须对目的蛋白具有足够高的亲和力,但并不能高到阻碍随后蛋白的释放,并且不能使其变性。用高浓度自由配体的洗脱液、不同 pH 或不同离子强度的洗脱液可以将结合蛋白从柱上洗脱下来。图 5-8 即为亲和层析纯化蛋白的一个范例。对于特定蛋白(有结合能力)来说,亲和层析的分离效果通常要比其他层析技术好得多(例如表 5-3)。

102

104

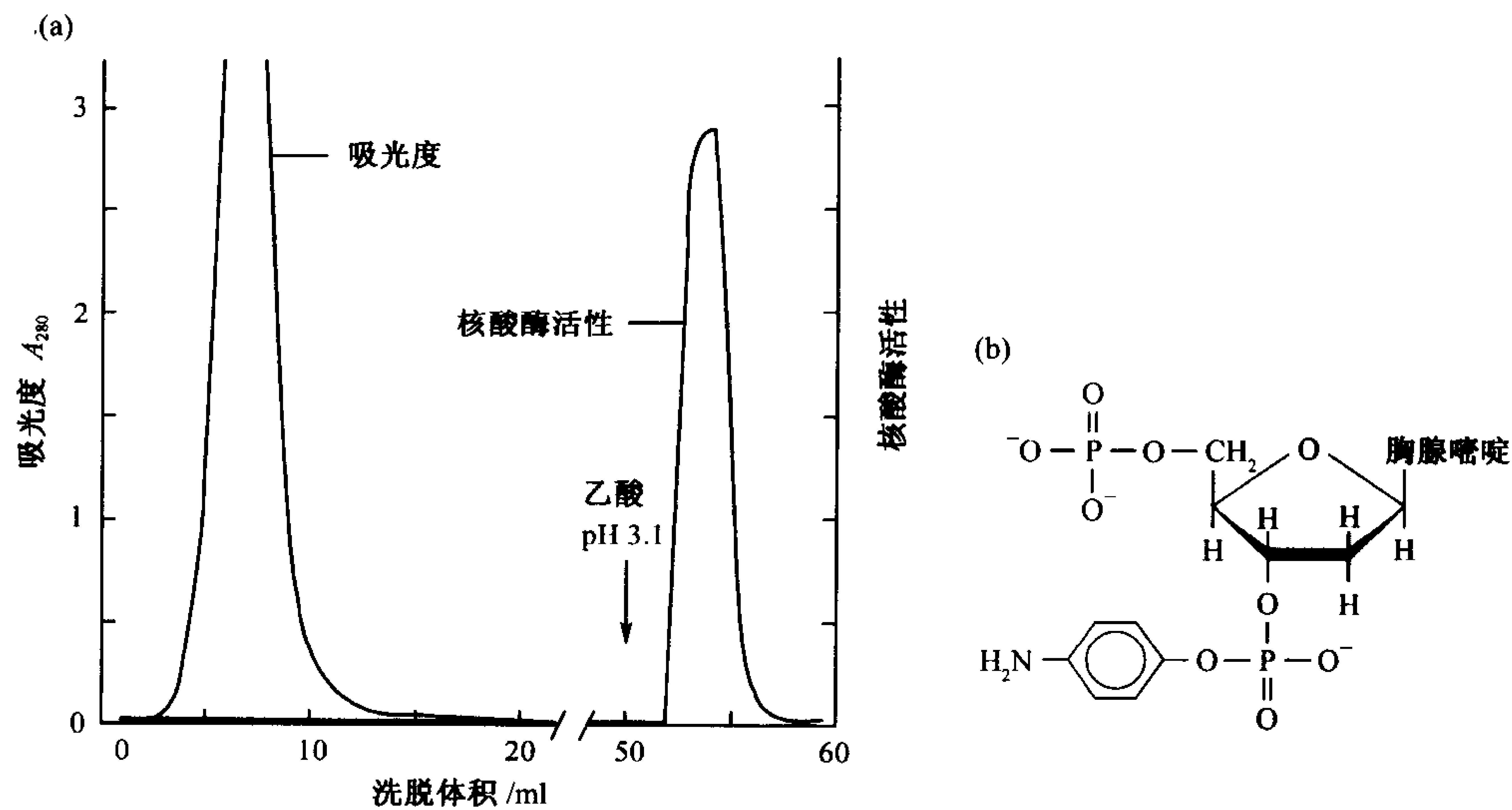


图 5-8 用亲和层析纯化一种酶

(a)葡萄球菌的核酸酶(一种 DNA 水解酶)经过带有焦磷酸胸腺嘧啶衍生物[见(b)]的亲和层柱后被纯化。大约有 40mg 的物质被上样,只有核酸酶结合到固定的配体上。50ml pH8.0 的缓冲液洗脱后,用 0.1 mol/L 醋酸洗脱下大约 8.2mg 纯酶。注意随着核酸酶的洗脱也洗出了所有的酶活(黄线)。[引自 Cuatrecasas, P., Wilchek, M., and Anfinsen, C.B., Proc. Natl. Acad. Sci. 61, 636(1968)]

表 5-3 兔肝脏葡萄糖激酶的纯化

步骤	比活力/(nkat/g)[a]	产率/%	纯化倍数[b]
A 方案:传统层析过程			
1. 肝上清液	0.17	100	1
2. $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀	*c*	*c*	*c*
3. DEAE 层析 I	4.9	52	29
4. DEAE 层析 II	23	45	140
5. DEAE 层析 III	44	33	260
6. DEAE 层析 IV	80	15	480
7. 凝胶过滤层析	130	15	780
B 方案:亲和层析过程			
1. 肝上清液	0.092	100	1
2. DEAE 层析	20.1	104	220
3. 亲和层析[d]	420	83	4500

[a] 一个 kat 是指在标准条件下每秒转化 1mol 底物所需要的酶量。$1nkat = 10^{-9}$ kat。

[b] 通过比活性计算,第一步被人为地定义为 1。

[c] 在这一步中活性不能被准确测定,因为不能确定其他酶的污染。

[d] 亲和层析的配体是葡萄糖胺(一种葡萄糖激酶抑制剂)。

来源:Cornish-Bowden, A., Fundamentals of Enzyme Kinetics, p. 48, Butterworths(1979), as adapted from Parry, *M.J. and* Walker, D.G., Biochem. J. 99, 266(1966), for Scheme A and from Holroyde, M.J., Allen, B.M., Storer, A.C., Warsey, A. S., Chesher, J.M.E, Trayer, I.P., Cornish-Bowden, A, and Walker, D.G., Biochem. J. 153, 363(1796), for Scheme B。

D. 蛋白质电泳

电泳(electrophoresis)即电场中离子的迁移，在节 3-4B 部分详细阐述。在这里，我们介绍它在分析和纯化蛋白质中的应用。

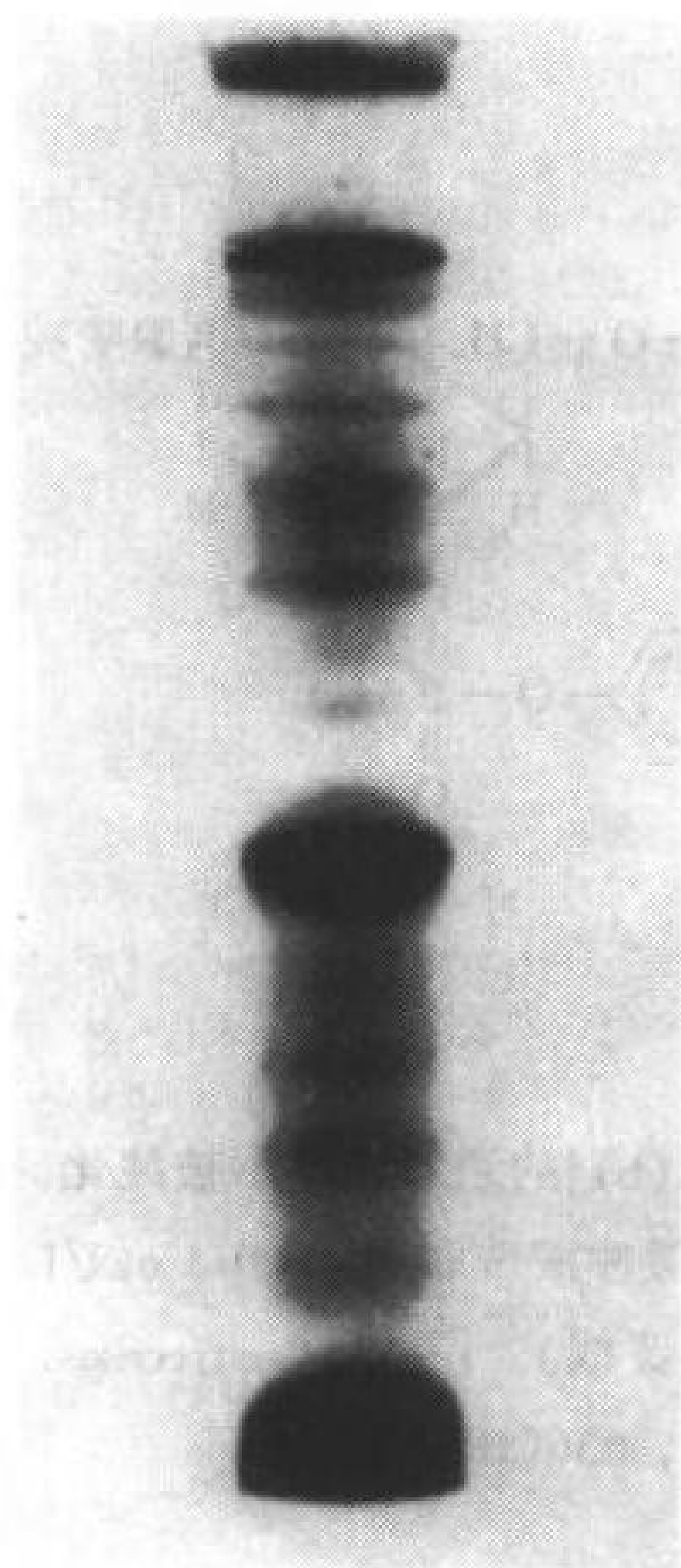


图 5-9 人血清中蛋白质电泳图

血清样品加于 0.5cm×4.0cm 内含聚丙烯酰胺凝胶的试管顶部。电泳后，蛋白质用氨基黑（测蛋白的染料）染色。（引自 Robert W. Hartley, NIH)

105

聚丙烯酰胺凝胶电泳

蛋白质电泳通常以特定孔径大小的琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶为载体，*以分子筛效应和电泳迁移率为基础来分离不同的分子*。但是，电泳与凝胶层析的不同在于，在相同电荷密度下，小分子的电泳迁移率比大分子电泳迁移率快。凝胶的 pH 值通常为 9(较高)，因此几乎所有的蛋白质都带负电荷，并且在通电状态下向正极迁移。在凝胶中，大小和带电量相似的分子以一条带移动。

电泳后，可利用适当的方法如染色使分离的条带可显现(图 5-9)。在制备型凝胶电泳中，蛋白要从凝胶薄片中洗脱出来，通常不用染色。如果样品中的蛋白是放射性的，将凝胶薄片干胶后，压在一张 X 射线感光胶片上。一段时间后(从几秒钟到几星期不等，依放射性强度而定)，胶片**放射自显影**(autoradiograph)，显示凝胶薄片上的放射性组分的位置(胶片相应部位变黑)。也就是说，只要在几秒钟之内就可以用位置敏感的放射性探测物(如电子胶片)来显示放射性组分的位置。如果目的蛋白的抗体可以得到，那么通过特异结合可以从众多蛋白质中探测到目的蛋白，此过程被称为**免疫印迹**(immunoblotting)或**蛋白质印迹**(Western blotting)。

SDS-PAGE

SDS-PAGE 是**聚丙烯酰胺凝胶电泳**(PAGE)中的一种，它使用去污剂十二烷基硫酸钠(SDS)作为变性剂。



$$SDS: [CH_3—(CH_2)_{10}—CH_2—O—SO_3^-]Na^+$$

像 SDS 这种双亲性的分子(节 2-1C)，能破坏稳定蛋白质的疏水间作用力，使蛋白质变性。在有 SDS 存在下，蛋白质呈杆状。并且，大多数蛋白质与 SDS 的结合率为每克蛋白质大约结合 1.4g SDS(大约是每两个氨基酸残基对应一个 SDS 分子)。SDS 带有大量负电荷，覆盖了蛋白本身的电荷而使蛋白质带负电。结果就是 SDS 处理过的蛋白具有相似的形状和质荷比。因此，可以通过凝胶过滤的效应，也就是根据分子质量的大小，用 SDS-PAGE 分离蛋白质。图 5-10 是 SDS-PAGE 的一个样例，具有明显的分辨力和可重复性。

实际上，通过 SDS-PAGE，可以确定蛋白的分子质量，精度为 5%～10%。在电泳中，蛋白质的相对迁移率和蛋白分子质量的对数之间成线性关系(图 5-11)。实际操作中，通过将目的蛋白和几种“标记”蛋白(已知分子质量的蛋白，其大小范围包括目的蛋白)共同电泳，可以确定目的蛋白的分子质量。因为 SDS 破坏了肽链间非共价键的相互作用，所测定的蛋白质分子质量为亚基

的分子质量。蛋白质亚基之间是否以二硫键结合,可以通过在制备电泳样品时,加入或不加还原剂,如**巯基乙醇**(2-mercaptoethanol, $HSCH_2CH_2OH$,可以断裂二硫键),然后经过 SDS-PAGE 来检测。

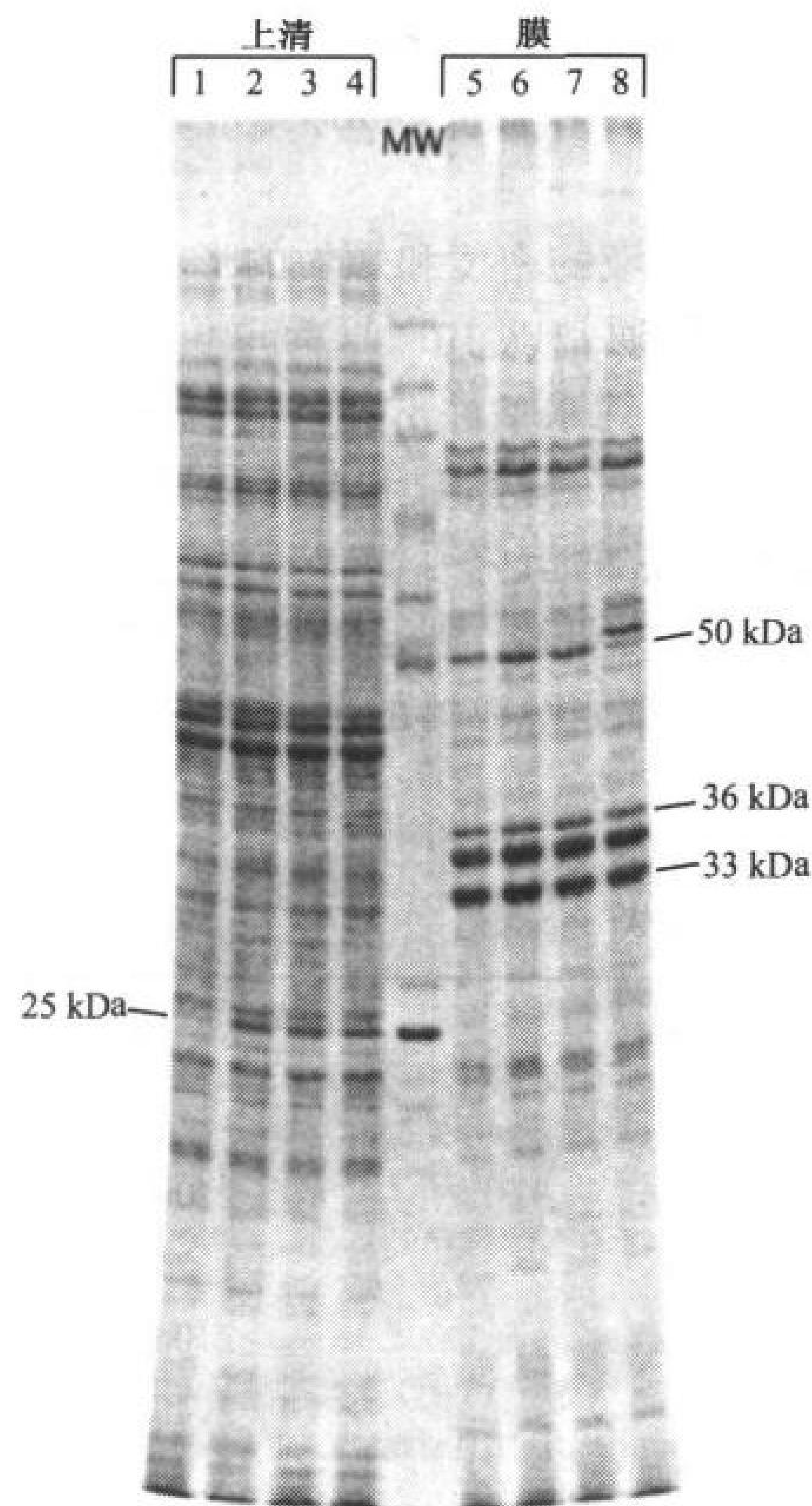


图 5-10　SDS-PAGE
对沙门氏菌处理后,上清样品(左)和膜碎片样品(右)在35cm长、0.8mm厚的聚丙烯酰胺凝胶上的平行泳道中电泳。标有MW的泳道,含有标准分子质量物质。(Courtesy of Giovanna F. Ames, University of California at Berkeley)

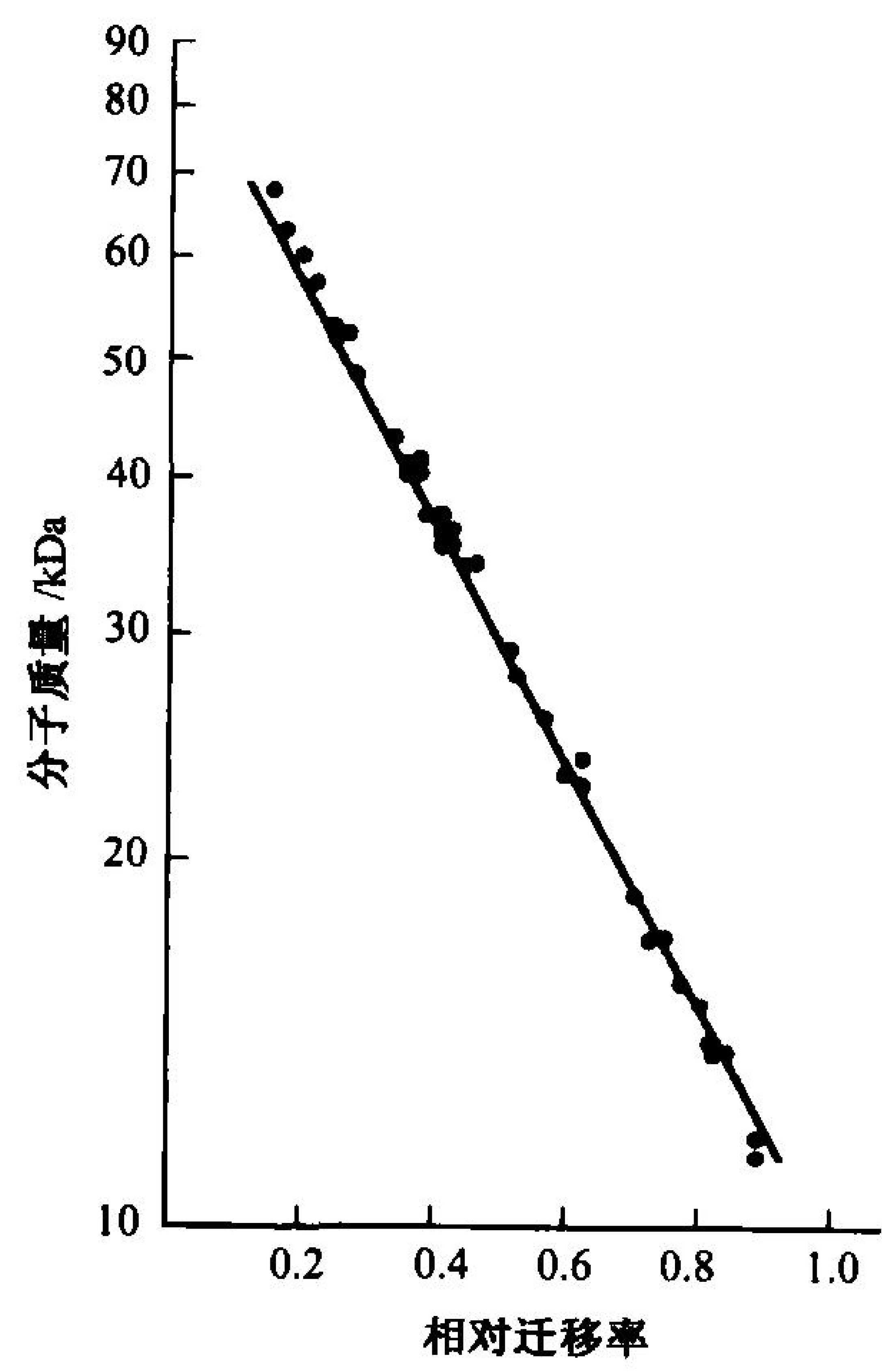


图 5-11　SDS-PAGE 中,蛋白质分子质量的对数和电泳迁移率之间的关系
分子质量在11~70kDa之间的37种蛋白质在图上点出。[引自 Weber, K. and Osborn, M., J. Biol. Chem. 244, 4406(1969)]

毛细管电泳

尽管有多种形式的凝胶电泳可以高效地分离带电分子,但是需要长达几个小时,并且它很难定量测定,操作也不能自动化。毛细管电泳(CE)则可以在很大程度上克服这些不利情况,这项技术是在非常细小的毛细管内完成电泳过程的(内径为20~75μm)。这种小毛细管散热很快,因此可以负荷高电场,这样就将分离时间减少到几分钟。CE技术有非常高的分辨率,并且同HPLC一样可以自动完成,也就是说,自动上样并且即时样品检测。因为CE只能分离少量的物质,所以它在很大程度上只作为分析工具使用。

E. 超速离心

106

如果一个含有沙子和水的容器被摇晃后静止,由于地球重力(重力加速度 $g = 9.821 \mathrm{m \cdot g^{-2}}$)

影响,沙子会很快沉到容器的底部。然而,在同样重力场下,溶液中的大分子则不表现出任何可观察到的沉降,这是因为它们无规则的热运动使它们均匀分散在整个溶液中。只有在巨大加速度的条件下,大分子才开始像沙粒一样沉淀。

大约在1923年,瑞典生化学家Svedberg制成的**超速离心机**(ultracentrifuge)能达到80 000r/min的速度,这样便可产生超过600 000g的离心场。使用这台仪器,Svedberg第一次阐述了蛋白质是有均一组成的大分子,并且许多蛋白质含有亚基。

在超速离心中,颗粒沉降的速度和它的分子质量相关(溶液的密度和颗粒的形状也影响沉降速度)。蛋白质的**沉降系数**(s,单位离心场力下的沉降速度)通常以10^{-13}s为单位来表示,这也就是我们所说的Svedbergs(S)。沉降系数通常要调整为20℃纯水条件下获得的值:$s_{20,w}$。表5-4列出一些蛋白质在20℃纯水条件下的沉降系数。注意:蛋白沉降系数和分子质量之间并非线性关系,因此s值不是累加的。[**纤维蛋白原**(fibrinogen)异常的沉降系数是因为它延伸的纤维形状,这个形状使它的沉降速度相对于等分子质量的球形蛋白要慢一些。]蛋白质的沉降系数范围从1~50S;病毒的沉降系数范围从40~1000S。亚细胞颗粒如线粒体的沉降系数,能达到上万S。

表5-4 某些蛋白的沉降系数

蛋　白	分子质量/kDa	沉降系数$s_{20,w}$/S
脂肪酶(牛奶)	6.7	1.14
核糖核酸酶A(牛胰腺)	12.6	2.00
细胞色素c(牛心脏)	13.4	1.71
肌红蛋白(马心脏)	16.9	2.04
α-胰凝乳蛋白酶(牛胰腺)	21.6	2.40
响尾蛇毒素(响尾蛇)	29.9	3.14
半刀豆球蛋白B(水豆)	42.5	3.50
白喉毒素	70.4	4.60
细胞色素氧化酶(绿脓杆菌)	89.8	5.80
乳酸脱氢酶H(雏鸡)	150	7.31
过氧化氢酶(马肝脏)	222	11.20
纤维蛋白原(人)	340	7.63
血蓝蛋白(乌贼)	612	19.50
谷氨酸脱氢酶(牛肝脏)	1015	26.60
芜菁黄花叶病毒蛋白	3013	48.80

来源:Smith, M.H., in sober, H.A.(ED.), Handbook of Biochemistry and Molecular Biology (2nd ed), p.C-10, CRC Press (1970)。

107

大约在1970年以前,都使用**分析超速离心机**(analytical ultracentrifuge),可以肉眼观测到大分子沉降的仪器,来确定分子质量。近些年来,凝胶层析和SDS-PAGE已经被证实为更方便的方法。然而,分析超速离心机仍在使用,主要用于测定非共价连接的分子系统,其中包括蛋白质亚基和其他形成大分子复合物的分子。

制备超速离心(preparative ultracentrifugation)中，是在惰性溶液体系中沉降分子，离心管中的溶液浓度从上到下不断增大，因此密度逐渐变大。**密度梯度**(density gradient)的应用更加增大了超速离心的分辨率。在**区带超速离心**(zonal ultracentrifugation)中，大分子样品溶液铺在密度梯度的顶层，惰性介质通常用蔗糖。通过离心，每种大分子以它的沉降系数所确定的最大速度通过梯度，以区带移动，不同分子区带可以相互分离(图 5-12)。离心后，刺穿试管底部，分级收集被分离的大分子。

在**平衡密度梯度离心**(equlibrium density gradient centrifugation)中，样品溶解于相应浓度的溶液中，惰性介质为高密度、扩散快的物质，如 CsCl。在高速运转下，产生高离心场力，使 CsCl 形成密度梯度。样品中各成分分别停留在和它们密度相同的梯度溶液层中，形成条带。然后每个条带可以被分开收集，像区带超速离心中那样(图 5-12)。

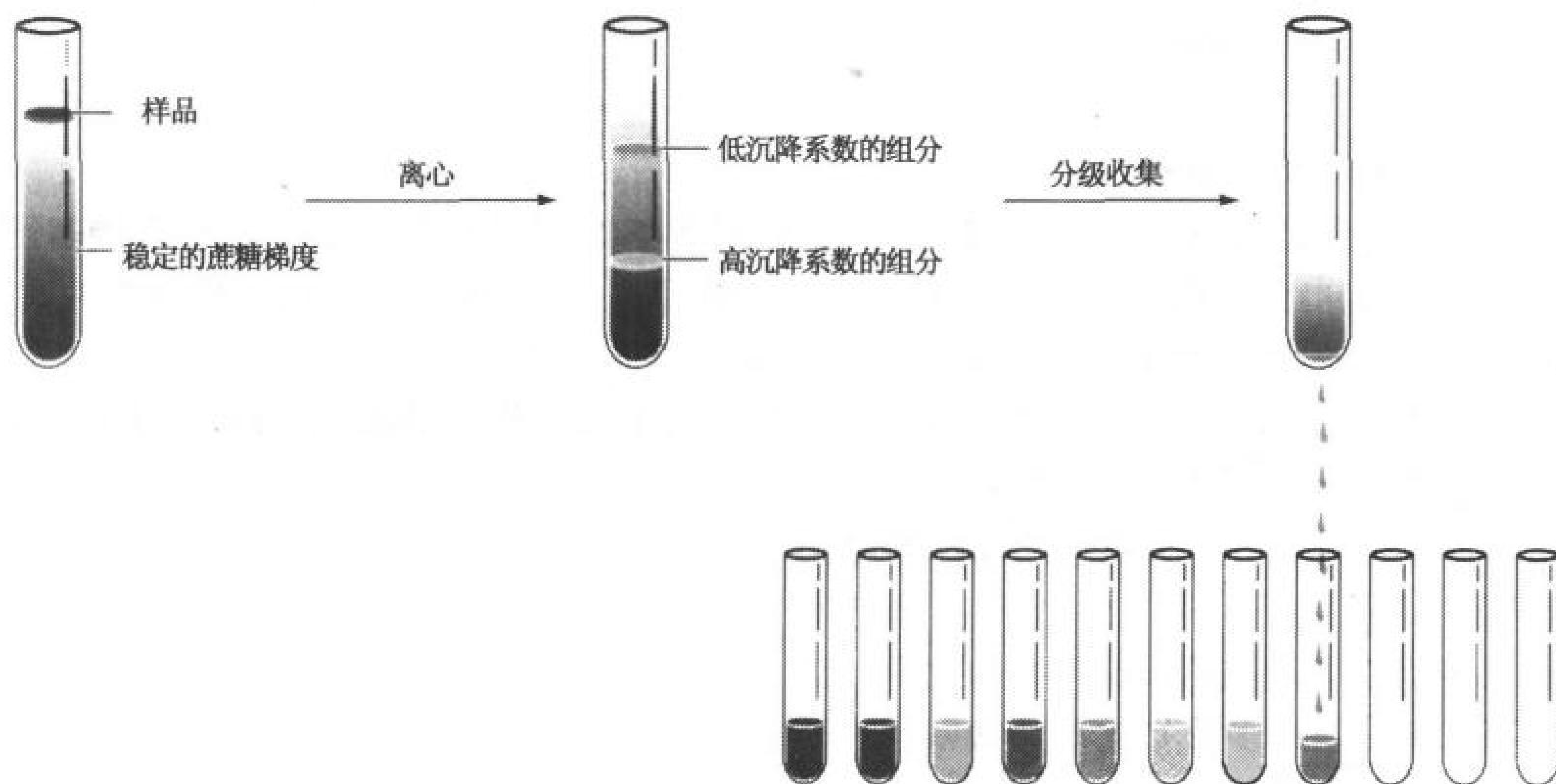


图 5-12　区带超速离心

样品置于蔗糖密度梯度层上(左边)。通过离心(中间)，不同颗粒根据它们的质量，沉降速度不同。离心后，刺穿试管底部，分级收集分开的颗粒(右边)。在平衡密度梯度离心中，离心管填充样品溶液和惰性物质(通常是 CsCl)。当离心管转动时，CsCl 产生密度梯度。

3. 蛋白质测序

第一个被测序的蛋白质是牛胰岛素。在 1953 年，Frederick Sanger 报道了它的完整序列(Sanger 随后发明了 DNA 链末端终止测序法；节 3-4C)，并且从此确定蛋白质有独一无二的共价结构。现在已经知道成千上万种多肽的氨基酸序列。由于以下原因，这些信息是颇有价值的：

1) 蛋白的氨基酸序列是判定蛋白质三级结构的前提条件，对于理解它们作用的分子机制也是必要的。
2) 通过比较来源于不同物种间类似的蛋白质序列可以洞悉蛋白质的功能并能够揭示出这些蛋白质以及产生它们的生物体之间的进化关系。

108

3) 许多遗传性疾病都是由于蛋白质中单个氨基酸的突变造成的。氨基酸序列分析可以帮助进一步发展疾病的诊断方法和有效治疗。

确定胰岛素的 51 个残基序列(图 5-1)用了大约 10 年和近 100g 蛋白质。现在，一级结构的测定程序是非常精确并且自动的，大部分蛋白都可在几天内完成自动测序，并且仅用几微克物质。质谱分析法可以完成长达 25 个残基的多肽的测序(这个技术可以直接测定离子化得到的多肽片段)。然而，蛋白质测序的基本途径和 Sanger 所建立的测序过程是相似的。简言之，*蛋白质必须首先裂解成可测定的足够小的单个片段，然后通过各片段的重叠序列重新构建出起始蛋白质的一级结构。*

A. 预备步骤

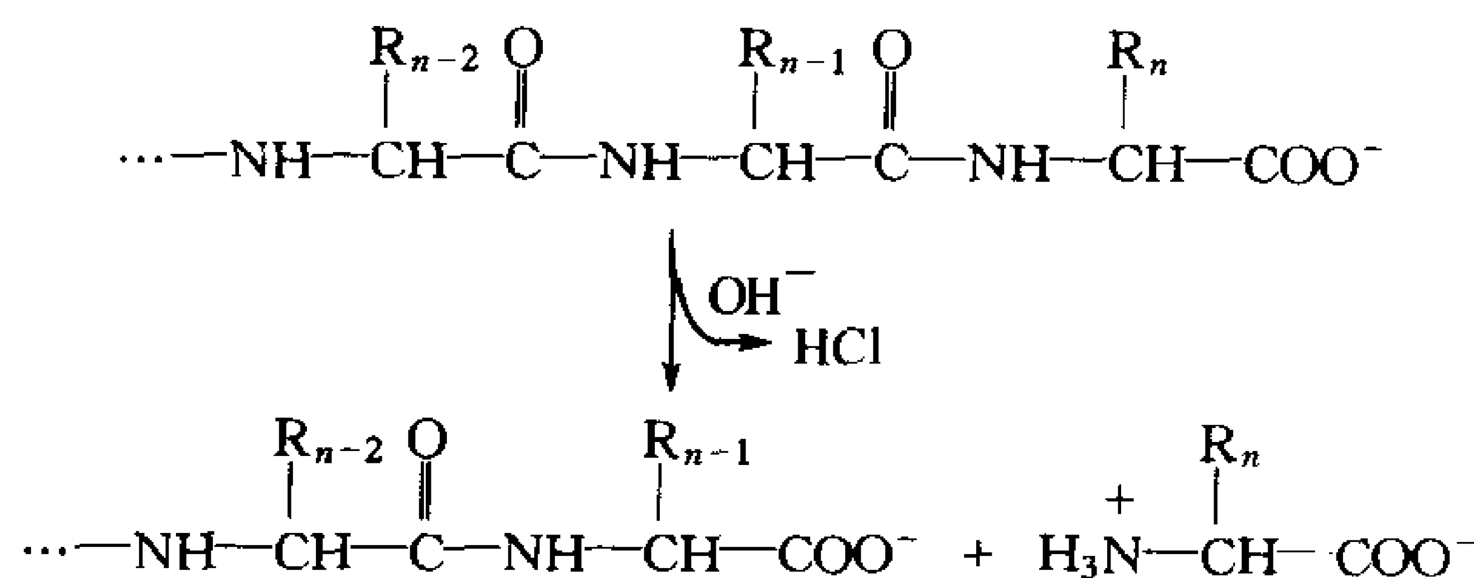
一个蛋白质完整的氨基酸序列包括它各个亚基(如果有的话)的序列信息，因此测序开始前必须确定和分离蛋白质的亚基。

末端分析揭示不同类型亚基的数目

如果不经化学修饰，每条多肽链都有一个 N 末端和 C 末端残基。*鉴定这些***末端基团**(end group)，就能判定蛋白中化学性质不同的多肽链的数目。例如，胰岛素有相同数量的两种 N 末端残基，Gly 和 Phe，这就说明胰岛素由两条不相同的多肽链组成。

鉴定多肽的 N 末端有几种方法。荧光复合物 **1-二甲氨基萘-5-磺酰氯(丹磺酰氯)**与 N 末端氨基酸的 α-氨基反应生成丹磺酰多肽(图 5-13)。酸水解释放被丹磺酰基修饰的 N 末端残基，用色谱法分离并通过它的强黄色荧光加以鉴定(节 5-3C)，这个过程每次从多肽 N 末端释放一个氨基酸残基。

鉴定多肽 C 末端残基没有可行的化学方法。但是，经常用**羧肽酶**(carboxypeptidase)来测定，这个酶可以催化水解多肽 C 末端的残基：



然后可以分离和鉴别所释放的氨基酸。同样，**氨肽酶**(aminopeptidase)可以水解多肽 N 末端残基；氨肽酶和羧肽酶都属于**外肽酶**(exopeptidase)。羧肽酶，与所有酶一样，对它们靶点的化学特征具有高度专一性。例如，**羧肽酶 A**，一种肠内的消化酶，它不能水解 C 末端 Arg 或 Lys 残基，或者是其他与 Pro 相连的残基。另一方面，**羧肽酶 B** 仅仅水解 C 末端 Arg 和 Lys 残基，但是要求它们不与 Pro 相连。酶的这种专一性要求对酶参与的末端基团分析要谨慎操作。因为，如果一个羧肽酶剪切第一个残基慢而剪切第二个残基快，那么使用这个酶会产生两个氨基酸，这将表明存在两条不同的多肽链。

109

多肽链内或链间二硫键的断裂

为了分离以二硫键连接的多肽链，Cys 残基之间的二硫键必须被切断，并且保证各个肽链彻

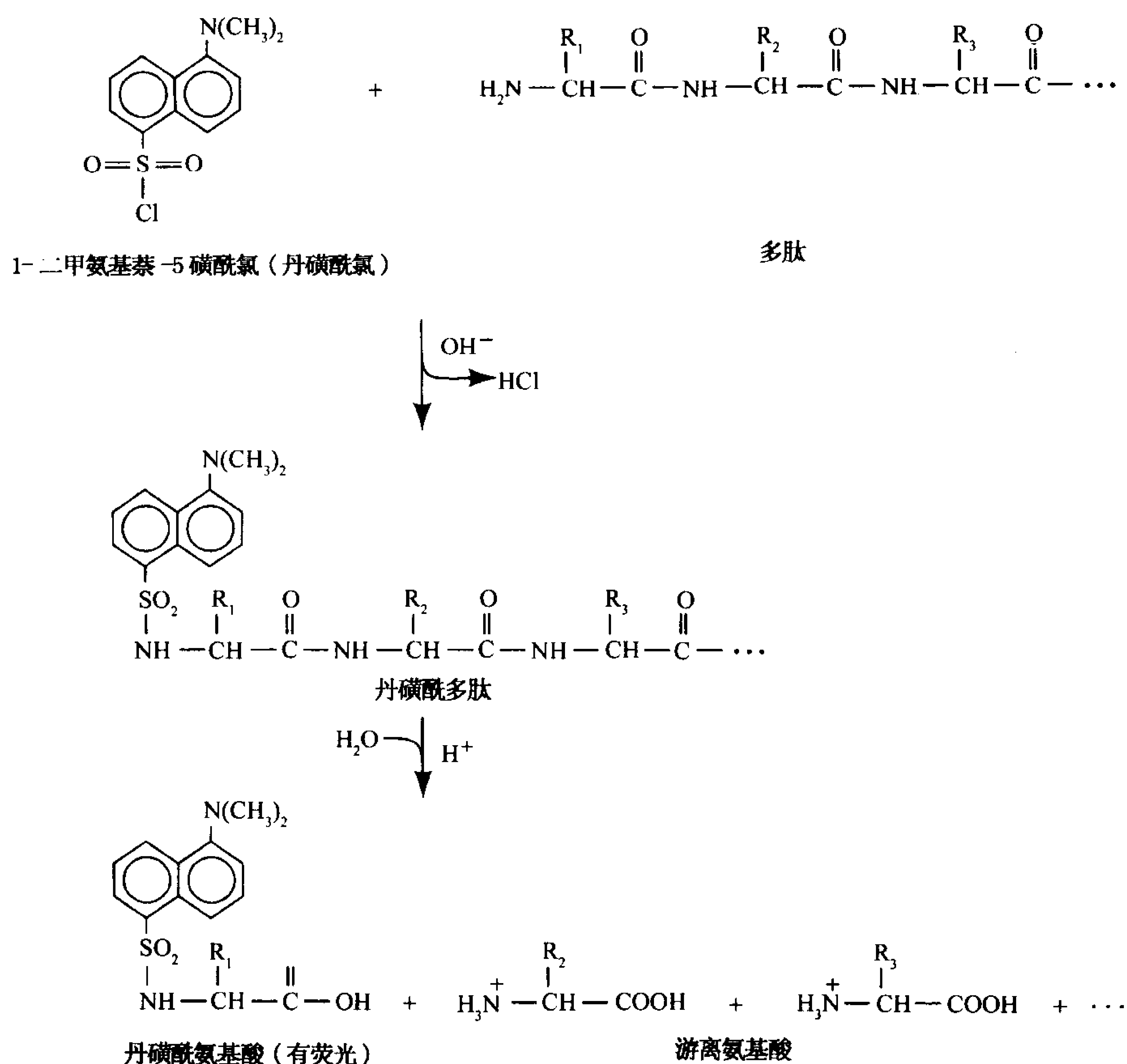
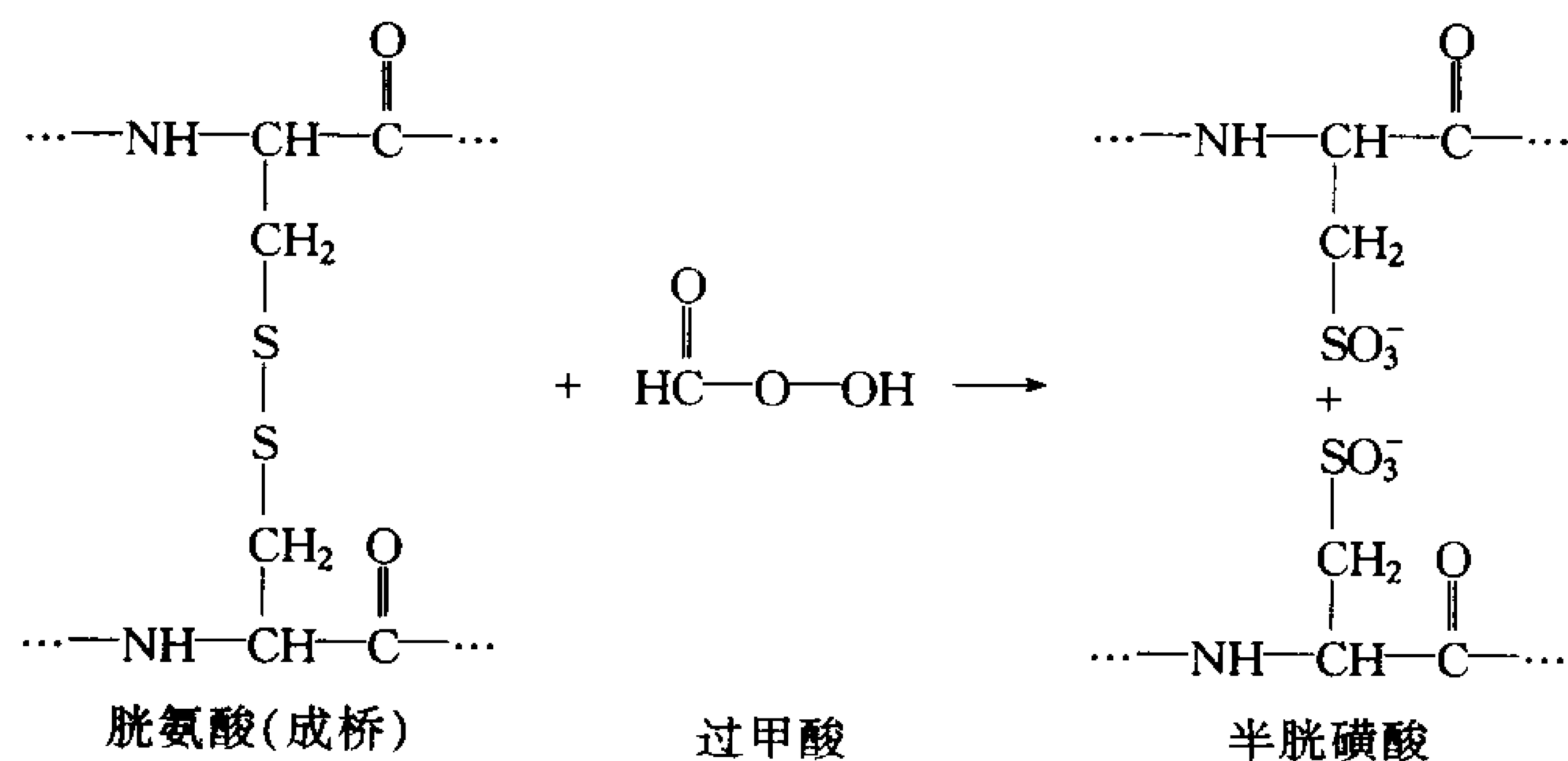


图 5-13　丹磺酰氯反应

丹磺酰氯与首个氨基的反应可以被用于多肽末端分析。

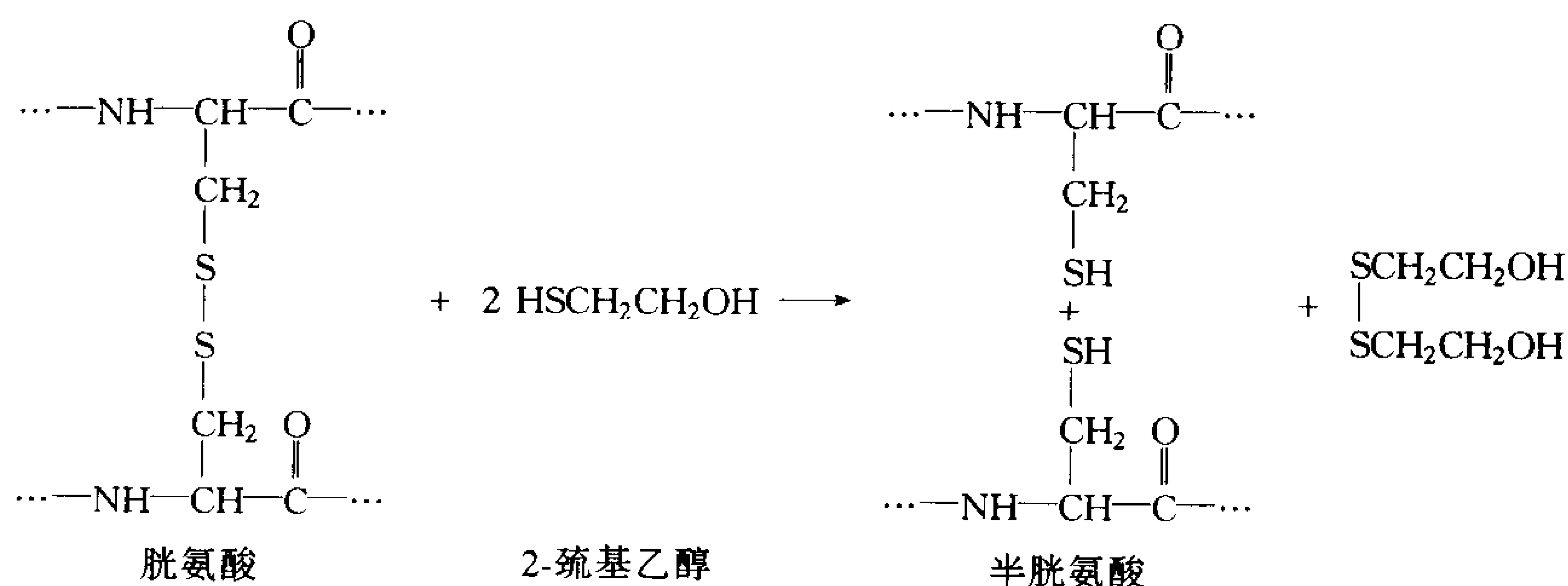
底成为直链(多肽中二硫键所在位点的残基可能不能与测序所用的酶或试剂接近)。二硫键可以被**过甲酸**(performic acid)氧化或被**硫醇**(mercaptan)(包含—SH的化合物)还原而断裂。过甲酸氧化反应,最先由 Sanger 开创,可以氧化所有 Cys 残基成为**半胱磺酸**(cysteic acid)残基,无论这些 Cys 残基是否连接成 S—S 桥:

110

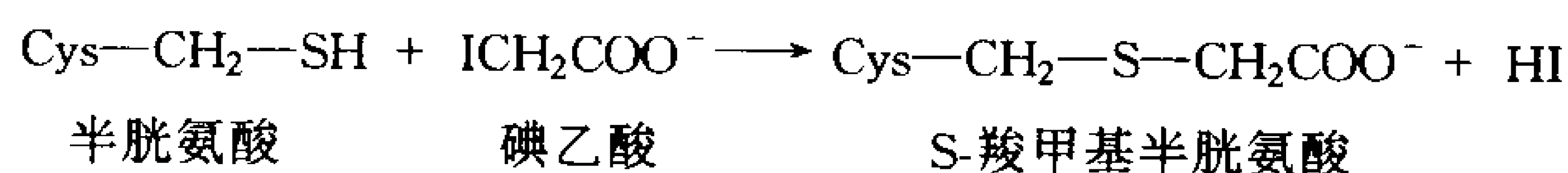


过甲酸氧化的一个主要不足是它同时氧化 Met 残基,并且部分破坏 Trp 侧链的吲哚基。

二硫键的还原性裂解通常是通过 2-巯基乙醇或其他硫醇的作用完成的：



还原后生成的游离巯基需要被烷基化，通常加入**碘乙酸**(iodoacetic acid)，是为了避免它被氧气氧化重新生成二硫键：



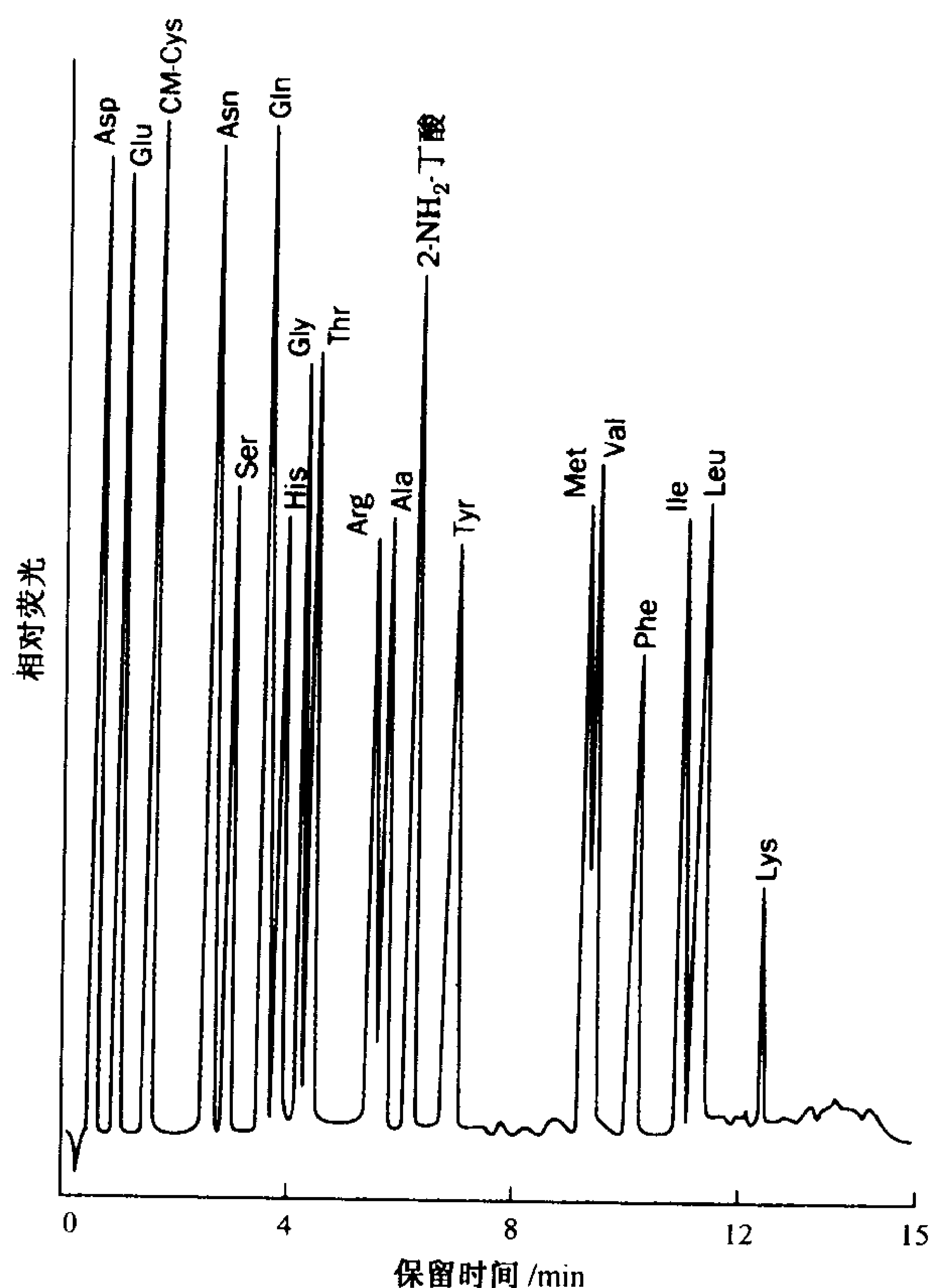


图 5-14 氨基酸分析

在用 HPLC 分离氨基酸前要用荧光标记氨基酸。[引自 Hunkapiller, M.W., Strickler, J.E., and Wilson, K.J., Science 226, 309(1984)]

鉴定多肽中氨基酸组成

在有些情况下，需要知道一个多肽链的**氨基酸组成**(amino acid composition)，也就是说，知道每种氨基酸残基的数量。这个信息对于蛋白质结构是一个线索，但是并不要求测出氨基酸序列。

测定多肽链的氨基酸组成，是通过将它完全水解，释放出所有氨基酸，然后分析。多肽链可以用化学方法(酸或碱)或酶的方法水解，尽管这些方法任何一个单独使用都不能令人完全满意。例如，酸水解可分解 Ser、Thr、Tyr 和 Trp，并且使 Asn 和 Gln 转变为 Asp 和 Glu。碱水解破坏 Cys、Ser、Thr 和 Arg。酶的水解通常是不彻底的，并且蛋白质常常会被自己酶解，导致反应混合物中全部氨基酸组成被弄得复杂化而难以测定。

通过可以分离氨基酸的仪器能定量分析多肽水解产物，有时要求分析之前或之后把氨基酸分子进行标记以便易于检测。通过特征洗脱体积(在 HPLC 中为保留时间；图 5-14)来鉴定氨基酸分子，然后通过吸光值或者荧光强弱来定量。现代氨基酸分析仪能够在不到 1h 内分析一个蛋白质

的降解产物,产物中每种氨基酸仅含有 1pmol。

B. 多肽裂解

超过 40～100 个残基的多肽不能直接通过 Edman 法测序,它们必须被酶或化学物质裂解成可测序的小片段。

不同的**内肽酶**(endopeptidase,这些酶催化水解肽链内的肽键)可以用来降解多肽成为片段。这些酶,同外肽酶一样,对要切割的肽键两侧的残基有要求(表 5-5)。消化酶中**胰蛋白酶**(trypsin)有很强的专一性,因此在用来断裂多肽的水解酶中,它是最有价值的。它断裂多肽链中不与 Pro 相连的 Arg 和 Lys(带正电的氨基酸)的羧基参与形成的肽键。

112

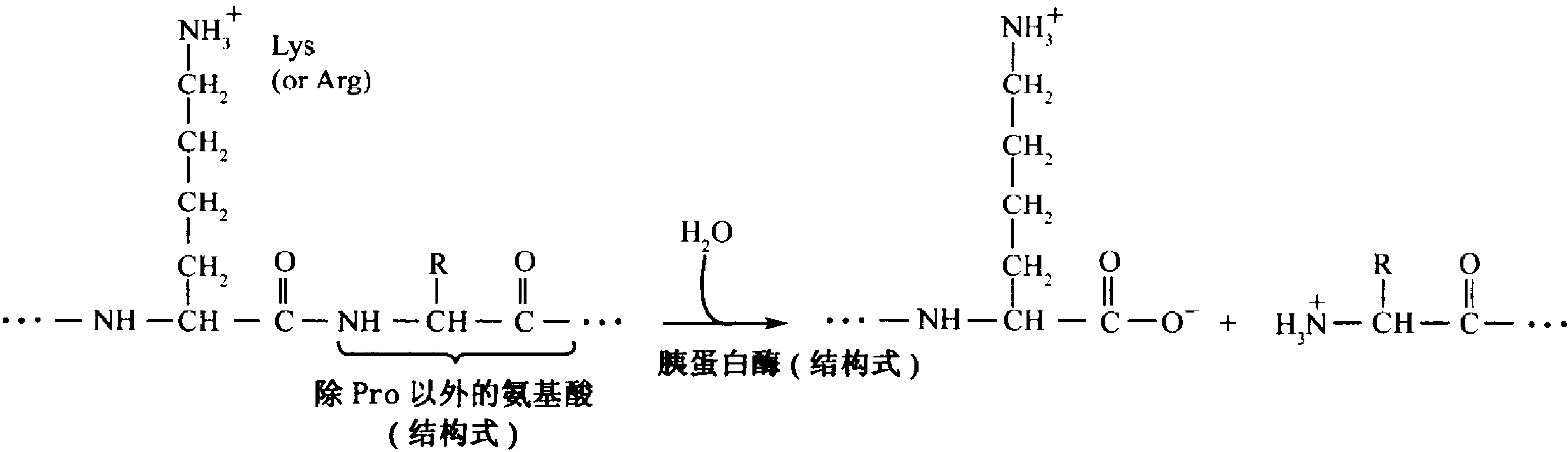


表 5-5 中列举的其他内肽酶没有胰蛋白酶的专一性强,经常会产生一系列有重叠区的多肽片段。然而,通过**限制性蛋白水解**(limited proteolysis),也就是说,通过调节反应条件和限制反应时间,使这些非专一性的内切酶产生一系列可以相互分离且不重叠的片段。

表 5-5　几种专一性内肽酶

$$-NH-\underset{|}{\overset{R_{n-1}}{C}}H-\overset{O}{\overset{\|}{C}}\uparrow NH-\underset{|}{\overset{R_n}{C}}H-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-$$

易断裂的肽键

酶	来源	特异性	注释
胰蛋白酶	牛胰腺	R_{n-1} = 带正电氨基酸:Arg、Lys; $R_n \neq$ Pro	高度专一性
胰凝乳蛋白酶	牛胰腺	R_{n-1} = 大的疏水残基:Phe、Trp、Tyr; $R_n \neq$ Pro	当 R_{n-1} 是 Asn、His、Met、Leu 时,裂解很慢
弹性蛋白酶	年胰腺	R_{n-1} = 小的中性残基:Ala、Gly、Ser、Val; $R_n \neq$ Pro	
嗜热芽孢菌蛋白酶	嗜热芽孢菌	R_n = Ile、Met、Phe、Trp、Val; $R_{n-1} \neq$ Pro	当 R_n 是 Ala、Asp、His、Thr 时,偶尔切割;热稳定
胃蛋白酶	牛胃黏膜	R_n = Leu、Phe、Trp、Tyr; $R_{n-1} \neq$ Pro	可以为其他;无专一性;最适 pH=2
内肽酶 V8	金黄色葡萄球菌	R_{n-1} = Glu	

有几种化学试剂可促进蛋白中特定残基肽键的断裂。最有用的为**溴化氰**(CNBr),它能够断裂 Met 羧基形成的肽键。

通过特定切割过程产生的肽片段对测序来讲可能仍然过大。在这种情况下,把它纯化,然后用不同的断裂技术进行第二轮处理,之后再进行测序。

C. Edman 降解

通过专一性裂解反应得到多肽片段后,一旦它们被分开,就可以鉴定它们的氨基酸序列。通常用 **Edman 降解**(以它的发明人 Pehr Edman 命名的)循环进行,完成测序。在此过程中,适度碱性条件下,**异硫氰酸苯酯**(PITC)和多肽链 N 末端氨基作用形成**苯氨基硫甲酰基**(PTC)化合肽(图 5-15)。用无水**三氟乙酸**处理产物,无水三氟乙酸可以断裂 N 末端的肽键而不能水解其他多

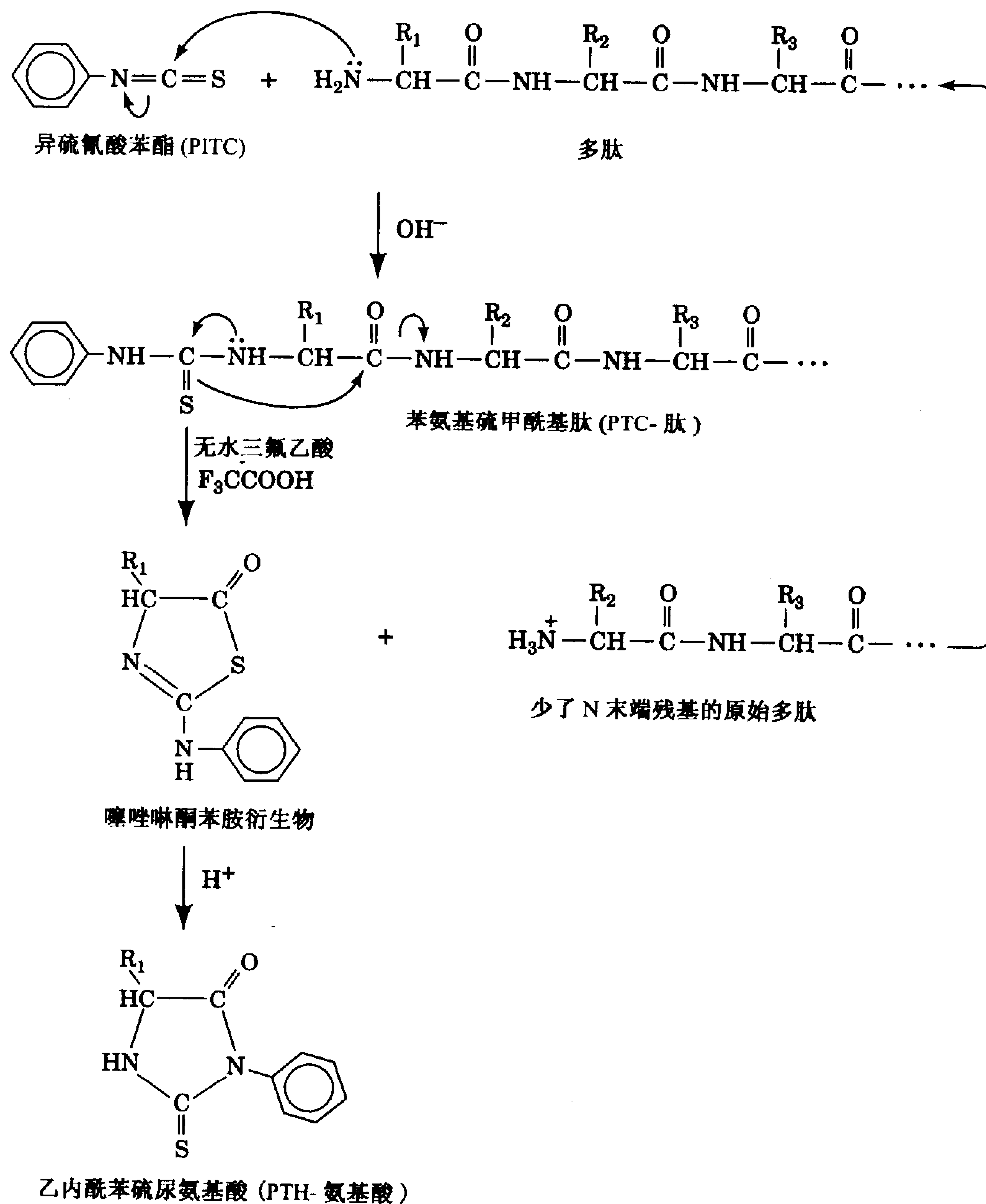


图 5-15 Edman 降解

反应发生分为三个阶段,每步条件都不同。在可控制的模式下,氨基酸残基被一个个从 N 末端移走。

肽键,生成**噻唑啉酮**衍生物。Edman降解只释放N末端氨基酸而保留多肽键其余部分是完整的。Edman降解释放N端氨基酸而保留其他部分多肽链。噻唑啉酮氨基酸被选择性地用有机溶剂从溶液中萃取出,然后用稀酸处理转化为更稳定的**乙内酰苯硫脲**(PTH)衍生物。这种PTH-氨基酸可通过色谱来鉴定。这样,循环进行Edman降解,在每个循环后鉴定新释放的PTH-氨基酸,这样就可由N末端逐渐向内测定多肽氨基酸的序列。

Edman降解技术已经可以自动且准确完成,节约大量时间和物质。Edman和Geoffery Begg发明了第一台自动仪器,命名为测序仪。在现代仪器中,肽样品放置在玻璃纤维纸盘子上干燥,准确量的试剂以蒸气的形式用氩气流程序化的间隔送入仪器,进行测定。最多可以鉴定100个残基的肽链,在此之后,就会有不完全反应、副反应和肽丢失等累积效应存在,鉴定就不可靠了。即使是少于1pmol的PTH-氨基酸也能被检测且鉴定,所以当肽少到5~10pmol的情况下,序列分析也可以进行(不到0.1μg,肉眼看不到的量)。

D. 蛋白质序列的重建

113

每个肽段测序完成后,则要确定它们在原始多肽链中的顺序。这需用不同专一性试剂对多肽进行裂解,并测定片段氨基酸序列,然后对具有重叠区域多肽的氨基酸顺序进行比较(图5-16)。

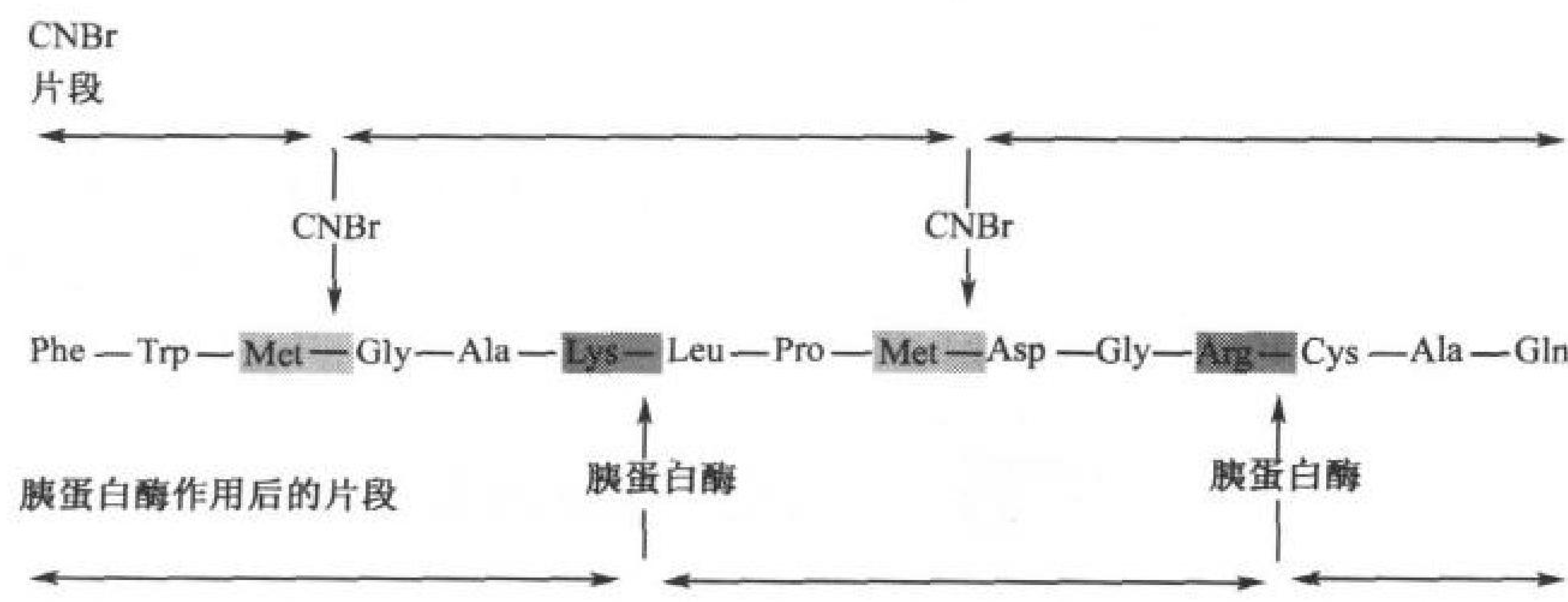


图5-16 产生重叠片段来判定多肽氨基酸顺序
在这个图例中,有两组有重复区域的肽段,一组是由胰蛋白酶作用切割多肽中Arg、Lys之后的肽键,另一组在CNBr的反应中,所有Met后的肽键都被切割。

氨基酸序列分析的最后一步是判定二硫键(如果有的话)的位置。切割一个含有完整二硫键的蛋白质样品,产生成对的肽段,每个肽段中都含有一个Cys残基,并且以二硫键相连。分离出这对以二硫键连接的多肽片段后,断开二硫键并且烷基化(节5-3A),然后确定两个肽段的氨基酸序列(图5-17)。通过比较这样成对的肽段和蛋白质序列间的联系,就可以确定二硫键的位置。

114

一个蛋白质氨基酸序列被确定后,通常会公开在公共数据库上如Swiss-Prot。核苷酸数据库,能够提供氨基酸序列,包括GenBank。这些数据库和其他更专业内容的数据库可以通过世界互联网登陆(http://expasy.hcuge.ch 是Swiss-Prot的网址,http://www.ncbi.nlm.nih.gov 是GeneBank的网址)。网上连接允许快速更新,并且可以相互核查序列的信息。

即使当相应核苷酸序列已知时,氨基酸序列仍然具有价值,因为蛋白质序列可提供蛋白质结

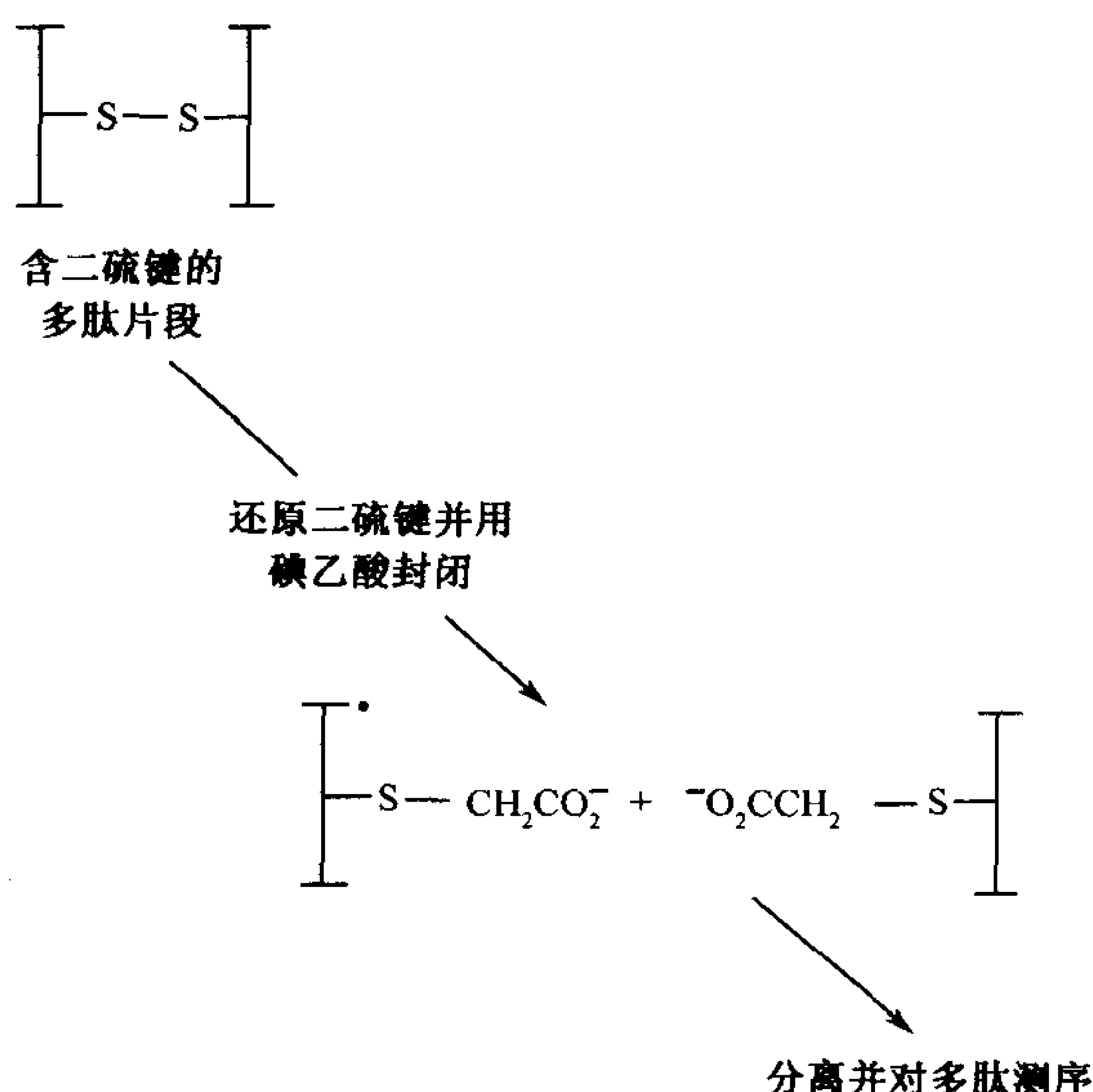


图 5-17 确定二硫键的位置

在这个方法中，从蛋白样品中得到有二硫键连接的一对肽段，用还原剂还原并且被分别测序，最终在完整蛋白中定位二硫键。

构信息而核酸序列则不能表明(见框 5-2)。利用适当的软件(数据库站点可以获得)，研究者搜寻数据库可以发现来自不同生物体而序列相似的蛋白质。即使是很小的片段，也足以找到它的“母”蛋白，或是另一物种中它的同源蛋白。

框 5-2 生物化学相关内容

蛋白质与核酸序列

尽管鉴定和测定相应的基因序列后，可以很容易推断出其蛋白质的序列，但由于许多原因，蛋白质测序仍然是必不可少的工具。例如，只有蛋白质测序才能知道蛋白质中二硫键的位置。另外，许多蛋白在合成之后被修饰。举例来说，蛋白质中的某些残基被切除后才能成为具有活性的分子(如图 5-1 所示的有 51 个残基的胰岛素，最初合成时是一条有 84 个残基的多肽，经过水解过程，形成小一些的有两条链的形式)。氨基酸则可以被糖类、磷酸基团和乙酰基等修饰。尽管这些修饰的部分是发生在特定的氨基酸序列上，并且是由核酸序列所决定的，但是只有蛋白测序能够证实它们在什么地方发生和是否真正地发生。

任何生化操作过程，无论如何谨慎，都会偶尔发生错误。核酸测序中出错会比蛋白测序出错影响更大：因为遗传密码是由连续的核苷酸三联体构成的，每一个密码决定一个氨基酸残基，单个核苷酸的插入和删除，这只是个常见的错误，都将影响基因的“读框”，因此从这点开始，所预计的氨基酸顺序都将改变。这样，由于蛋白与核酸序列的一一对应，便可以用其中一个去验证另一个的准确性。然而，异常情况有时表明“普遍的”遗传密码也具有例外，例如，线粒体和某种原生动物翻译 DNA 序列得到的氨基酸序列，和大多数生物略有不同(节 26-1C)。在一些情况下，核酸和蛋白质序列间的差异只是反映了一个种群中一种蛋白的不均匀性。

4. 蛋白质的进化

生物体的遗传物质决定了它所有蛋白质的氨基酸序列。由随机突变引起的基因变化经常改变蛋白质的一级结构。如果蛋白突变体在某种程度上增强,至少没有削弱这个物种增殖的能力,那么就会被遗传到下一代。许多突变体是有害的或产生致命的影响,因此会很快消失。很少情况下,突变体的出现会增强宿主的适应性。这就是**达尔文进化论**(Darwinian evolution)的本质。

A. 蛋白质序列的进化

相关物种中某种蛋白质的一级结构往往非常相似。在几乎所有的真核生物体中都有细胞色素 *c*。细胞色素 *c* 是线粒体内电子传递系统的组成之一(节 17-2),在 15～20 亿年前,当生物体进化到有呼吸能力时电子传递系统便可能出现了。Emanuel Margoliash、Emil Smith 等人都阐述了从酵母到人 100 多种真核生物中,细胞色素 *c* 的氨基酸序列复杂变化。来自不同物种的细胞色素 *c* 是从 104 到 112 个氨基酸残基不等的单一多肽链。表 5-6 中展示了这些蛋白中的 38 个序列,显示了它们的相似性,这从平行排列的残基中可以看到(这些残基根据物理性质用颜色标明)。表 5-6 底下一行,表明在 38 个残基部位(在超过 100 个序列中,有 23 个部位),相同残基出现在所有物种中。不同生物体中,剩余的大多数位置都被化学性质相似的残基所占据。仅在 8 个位置中,不同的序列存在 6 个甚至更多的不同残基。　115

根据进化论理论,相关物种都来自同一个祖先,所以也可以说它们的基因也同样起源于那个祖先的相应基因。通过探测现存蛋白质的序列,可间接地获得原始祖先的序列。细胞色素 *c* 是一种**进化保守**(evolutionarily conservative)的蛋白质,也就是说,它的序列在进化过程中只有微小变化。

序列比较能得到蛋白质结构和功能的信息

通常,通过对**同源蛋白**(homologous protein)一级结构的比较,来说明蛋白质残基中哪一个对其功能是必要的,哪一个相对次要一些,哪一个对功能基本没有影响。例如,在一系列相关蛋白的氨基酸序列中发现特定位点上的残基是相同的,表明**不变残基**(invariant residue)的化学和结构性质,对于蛋白质的某些基本功能是必需的。其余氨基酸位点对残基的要求就没这么严格,可以用具有相似特性的残基替换(例如,Asp 或 Glu, Ser 或 Thr 等等);这样的位点称之为**保守置换区**(conservatively substituted)。另一方面,有些特定位点可以容许许多不同的氨基酸存在,这表明对于保持该蛋白质的功能,这个位点不是特异的。这样的位置称之为**高变区**(hypervariable position)。

细胞色素 *c*,古老且必需的蛋白质,为什么在所有生物体中不是完全一致的呢? 尽管一个蛋白已经很适合它的功能,也就是说它不再需要进行生理学上的优化,但它仍然继续演化。随机突变的自然过程适时地发生着,改变蛋白质,但对其功能没有明显影响。此过程称为**中性漂移**(neutral drift)(有害突变通过自然选择,当然很快地被淘汰)。很明显,高变区的残基就是由中性漂移所造成的。　116

表 5-6 38 种生物中细胞

类群	物种	-9				-5				-1	1				5					10					15					20					25					30					35					40			
哺乳动物	人，黑猩猩									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	I	M	K	C	S	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	猕猴									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	I	M	K	C	S	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	马									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	驴									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	牛，猪，羊									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	狗									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	兔									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	加里弗尼亚灰鲸									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	大灰袋鼠									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	N	G	I	F	G	R	K	T	G	Q	A
其他脊椎动物	鸡，火鸡									a	G	D	I	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C	S	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	N	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	鸽									a	G	D	I	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C	S	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	N	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	北京鸭									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C	S	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	N	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	蛇鳄龟									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	N	G	L	I	G	R	K	T	G	Q	A
	响尾蛇									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	T	M	K	C	S	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	H	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	牛蛙									a	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	K	C	A	Q	C	H	T	C	E	K	G	G	K	H	K	V	G	P	N	L	Y	G	L	I	G	R	K	T	G	Q	A
	金枪鱼									a	G	D	V	A	K	G	K	K	T	F	V	Q	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	N	G	G	K	H	K	V	G	P	N	L	W	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	角鲨									a	G	D	V	E	K	G	K	K	V	F	V	Q	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	N	G	G	K	H	K	T	G	P	N	L	S	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
昆虫	Samia cynthia（一种蛾）					h	G	V	P	A	G	N	A	E	N	G	K	K	I	F	V	Q	R	C	A	Q	C	H	T	V	E	A	G	G	K	H	K	V	G	P	N	L	H	G	F	Y	G	R	K	T	G	Q	A
	烟草天蛾					h	G	V	P	A	G	N	A	D	N	G	K	K	I	F	V	Q	R	C	A	Q	C	H	T	V	E	A	G	G	K	H	K	V	G	P	N	L	H	G	F	F	G	R	K	T	G	Q	A
	螺丝蚕					h	G	V	P	A	G	D	V	E	K	G	K	K	I	F	V	Q	R	C	A	Q	C	H	T	V	E	A	G	G	K	H	K	V	G	P	N	L	H	G	L	F	G	R	K	T	G	Q	A
	果蝇					h	G	V	P	A	G	D	V	E	K	G	K	K	L	F	V	Q	R	C	A	Q	C	H	T	V	E	A	G	G	K	H	K	V	G	P	N	L	H	G	L	I	G	R	K	T	G	Q	A
真菌	面包酵母				h	T	E	F	K	A	G	S	A	K	K	G	A	T	L	F	K	T	R	C	L	Q	C	H	T	V	E	K	G	G	P	H	K	V	G	P	N	L	H	G	I	F	G	R	H	S	G	Q	A
	Candida krusei（一种酵母）			h	P	A	P	F	E	Q	G	S	A	K	K	G	A	T	L	F	K	T	R	C	A	Q	C	H	T	I	E	A	G	G	P	H	K	V	G	P	N	L	H	G	I	F	S	R	H	S	G	Q	A
	Neurospora crassa（一种霉菌）					h	G	F	S	A	G	D	S	K	K	G	A	N	L	F	K	T	R	C	A	Q	C	H	T	V	E	E	G	G	G	N	K	I	G	P	A	L	H	G	L	F	G	R	K	T	G	S	V
高杆植物	麦胚	a	A	S	F	S	E	A	P	P	G	N	P	D	A	G	A	K	I	F	K	T	K	C	A	Q	C	H	T	V	D	A	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	H	G	L	F	G	R	Q	S	G	T	T
	荞麦种子	a	A	T	F	S	E	A	P	P	G	N	I	K	S	G	E	K	I	F	K	T	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G	R	Q	S	G	T	T
	向日葵种子	a	A	S	F	A	E	A	P	P	G	D	P	T	T	G	A	K	I	F	K	T	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G	R	Q	S	G	T	T
	绿豆	a	A	S	F	B	E	A	P	P	G	B	S	K	S	G	E	K	I	F	K	T	K	C	A	Q	C	H	T	V	D	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G	R	Q	S	G	T	T
	花椰菜	a	A	S	F	B	E	A	P	P	G	B	S	K	A	G	E	K	I	F	K	T	K	C	A	Q	C	H	T	V	D	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G	R	Q	S	G	T	T
	南瓜	a	A	S	F	B	E	A	P	P	G	B	S	K	A	G	E	K	I	F	K	T	K	C	A	Q	C	H	T	V	D	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G	R	Q	S	G	T	T
	芝麻种子	a	A	S	F	B	E	A	P	P	G	B	V	K	S	G	E	K	I	F	K	T	K	C	A	Q	C	H	T	V	D	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G	R	Q	S	G	T	T
	蓖麻子	a	A	S	F	B	E	A	P	P	G	B	V	K	A	G	E	K	I	F	K	T	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G	R	Q	S	G	T	T
	棉籽	a	A	S	F	Z	E	A	P	P	G	B	A	K	A	G	E	K	I	F	K	T	K	C	A	Q	C	H	T	V	D	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G	R	Q	S	G	T	T
	白麻种	a	A	S	F	Z	E	A	P	P	G	B	A	K	A	G	E	K	I	F	K	T	K	C	A	Q	C	H	T	V	E	K	G	A	G	H	K	Q	G	P	N	L	N	G	L	F	G	R	Q	S	G	T	T
	不同氨基酸的数目										1	3	5	5	5	1	3	3	4	1	4	3	2	1	3	1	1	1	1	4	2	4	1	2	3	2	1	4	1	1	2	1	5	1	3	3	2	1	3	2	1	3	3

* **根据氨基酸侧链的极性特征，用阴影把它们表示出来。不变的或保守的取代残基用一种单色的竖向条带表示。链开始**

引自 Dickerson, R.E., *Sci. Am.* 226(4):58 – 72(1972), with corrections from Dickerson, R.E., and Timkovich, R., *in* Boyer, P.D. (Ed.),

亲水，酸性： D Asp　E Glu

亲水，碱性： H His　K Lys　R Arg　X TrimethylLys

极性，不带电： B Asn or Asp　G Gly　N Asn　Q Gln

S Ser　T Thr　W Trp　Y Tyr　Z Gln or Glu

疏水： A Ala　C Cys　F Phe　I Ile　L Leu

M Met　P Pro　V Val

色素 *c* 的氨基酸序列[a]

	45					50					55					60					65					70					75					80					85					90					95					100				104
P	G	Y	S	Y	T	A	A	N	K	N	K	G	I	I	W	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	V	G	I	K	K	K	E	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
P	G	Y	S	Y	T	A	A	N	K	N	K	G	I	I	W	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	V	G	I	K	K	K	E	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	A	N	E
P	G	F	T	Y	T	A	A	N	K	N	K	G	I	I	W	K	E	E	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	K	T	E	R	E	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
P	G	F	S	Y	T	A	A	N	K	N	K	G	I	I	W	K	E	E	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	K	T	E	R	E	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
P	G	F	S	Y	T	A	A	N	K	N	K	G	I	I	W	G	E	E	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	K	G	E	R	E	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
P	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W	G	E	E	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	T	G	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	K	E
V	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	K	D	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
V	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	K	G	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
P	G	F	T	Y	T	A	A	N	K	N	K	G	I	I	W	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	K	G	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	N	E
E	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	K	S	E	R	V	D	L	I	A	Y	L	K	D	A	T	S	K
E	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	K	A	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	Q	A	T	A	K
E	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	K	S	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	D	A	T	A	K
E	G	F	S	Y	T	E	A	N	K	N	K	G	I	T	W	G	E	E	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	K	A	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	D	A	T	S	K
V	G	Y	S	Y	T	A	A	N	K	N	K	G	I	I	W	G	D	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	T	G	L	S	K	K	K	E	R	T	N	L	I	A	Y	L	K	E	K	T	A	A
A	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	N	K	G	I	T	W	G	E	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	K	G	E	R	Q	D	L	I	A	Y	L	K	S	A	C	S	K
E	G	Y	S	Y	T	D	A	N	K	S	K	G	I	V	W	N	N	D	T	L	M	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	I	K	K	K	G	E	R	Q	D	L	V	A	Y	L	K	S	A	T	S	-
Q	G	F	S	Y	T	D	A	N	K	S	K	G	I	T	W	Q	Q	E	T	L	R	I	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	L	K	K	K	S	E	R	Q	D	L	I	A	Y	L	K	K	I	A	A	S
P	G	F	S	Y	S	N	A	N	K	A	K	G	I	T	W	G	D	D	T	L	F	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	A	G	L	K	K	A	N	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	S	T	K	-
P	G	F	S	Y	S	N	A	N	K	A	K	G	I	T	W	Q	D	D	T	L	F	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	A	G	L	K	K	A	N	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	Q	A	T	K	-
A	G	F	A	Y	T	N	A	N	K	A	K	G	I	T	W	Q	D	D	T	L	F	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	L	K	K	P	N	E	R	G	D	L	I	A	Y	L	K	S	A	T	K	-
A	G	F	A	Y	T	N	A	N	K	A	K	G	I	T	W	Q	D	D	T	L	F	E	Y	L	E	N	P	K	K	Y	I	P	G	T	K	M	I	F	A	G	L	K	K	P	N	E	R	G	D	L	I	A	Y	L	K	S	A	T	K	-
Q	G	Y	S	Y	T	D	A	N	I	K	K	N	V	L	W	D	E	N	N	M	S	E	Y	L	T	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	A	F	G	G	L	K	K	E	K	D	R	N	D	L	I	T	Y	L	K	K	A	C	E	-
Q	G	Y	S	Y	T	D	A	N	K	R	A	G	V	E	W	A	E	P	T	M	S	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	A	F	G	G	L	K	K	A	K	D	R	N	D	L	V	T	Y	M	L	E	A	S	K	-
D	G	Y	A	Y	T	D	A	N	K	Q	K	G	I	T	W	D	E	N	T	L	F	E	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	A	F	G	G	L	K	K	D	K	D	R	N	D	I	I	T	F	M	K	E	A	T	A	-
A	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	K	A	V	E	W	E	E	N	T	L	Y	D	Y	L	L	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	P	G	L	K	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	K	A	T	S	S
A	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	K	A	V	T	W	G	E	D	T	L	Y	E	Y	L	L	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	P	G	L	X	K	P	Q	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	D	S	T	E	-
A	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	M	A	V	I	W	E	E	N	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	P	G	L	X	K	P	Q	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	T	S	T	A	-
A	G	Y	S	Y	S	T	A	N	K	N	M	A	V	I	W	E	E	K	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	S	T	A	-
A	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	M	A	V	E	W	E	E	K	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	A	T	A	-
P	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	R	A	V	I	W	E	E	K	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	A	T	A	-
P	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	M	A	V	I	W	G	E	N	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	P	G	L	X	K	P	Q	E	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	A	T	A	-
A	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	M	A	V	Q	W	G	E	N	T	L	Y	A	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	A	T	A	-
A	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	M	A	V	Q	W	G	E	N	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	S	T	A	-
P	G	Y	S	Y	S	A	A	N	K	N	M	A	V	N	W	G	E	N	T	L	Y	D	Y	L	E	N	P	X	K	Y	I	P	G	T	K	M	V	F	P	G	L	X	K	P	Q	D	R	A	D	L	I	A	Y	L	K	E	S	T	A	-
6	1	2	3	1	2	5	1	1	2	6	4	3	2	7	1	7	4	5	2	2	5	4	1	1	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	3	1	5	1	2	2	1	6	9	2	1	7	2	2	2	2	2	2	6	4	4	5	4

的字母 a 表示 N 端氨基酸是乙酰化的；h 表示没有乙酰化。

The Enzymes (3rd ed.), Vol 11, pp.421–422, Academic Press (1975).

构建系统进化树

通过比较同源蛋白质的氨基酸序列可以更进一步得到关于进化关系的结论。统计蛋白质间氨基酸的不同是评估进化差异的最简单方法。例如，表 5-6 中显示哺乳动物比昆虫的细胞色素 117 c 更近似于灵长目的细胞色素 c（哺乳动物间存在 8～12 个残基差异，而昆虫与哺乳动物之间存在 26～31 个残基差异）。同样地，真菌和哺乳动物间有 45～51 个残基的不同，与昆虫间有 41～47 个不同，与高等植物有 47～54 个不同。这些差异的顺序很大程度上与经典分类学吻合。

通过计算机分析同源蛋白质序列，构建**系统进化树**(phylogenetic tree)，用图表来说明产生同 118 种蛋白质的生物体祖先的亲缘关系。细胞色素 c 构建的系统进化树的骨架由图 5-18 展示。其他蛋白质也可以得到相类似的树。对于一个树枝上的生物来讲，每个枝节点都表明有一个推论上的共同祖先。枝节点间的距离表示蛋白质中每 100 个残基中，氨基酸残基差异的数目。这种进化树比起宏观分类学更能定量反映不同物种间的关系。

注意现代各种生物的细胞色素 c 到最低点（产生这种蛋白的最早祖先）的进化距离大致相同。因此，“低等”生物不代表早期的生命形式，而且并没有停止进化。图 5-18 包括所有物种的细胞色素 c，无论是所谓的“原始的”还是“高级的”，都有相同程度的演化。

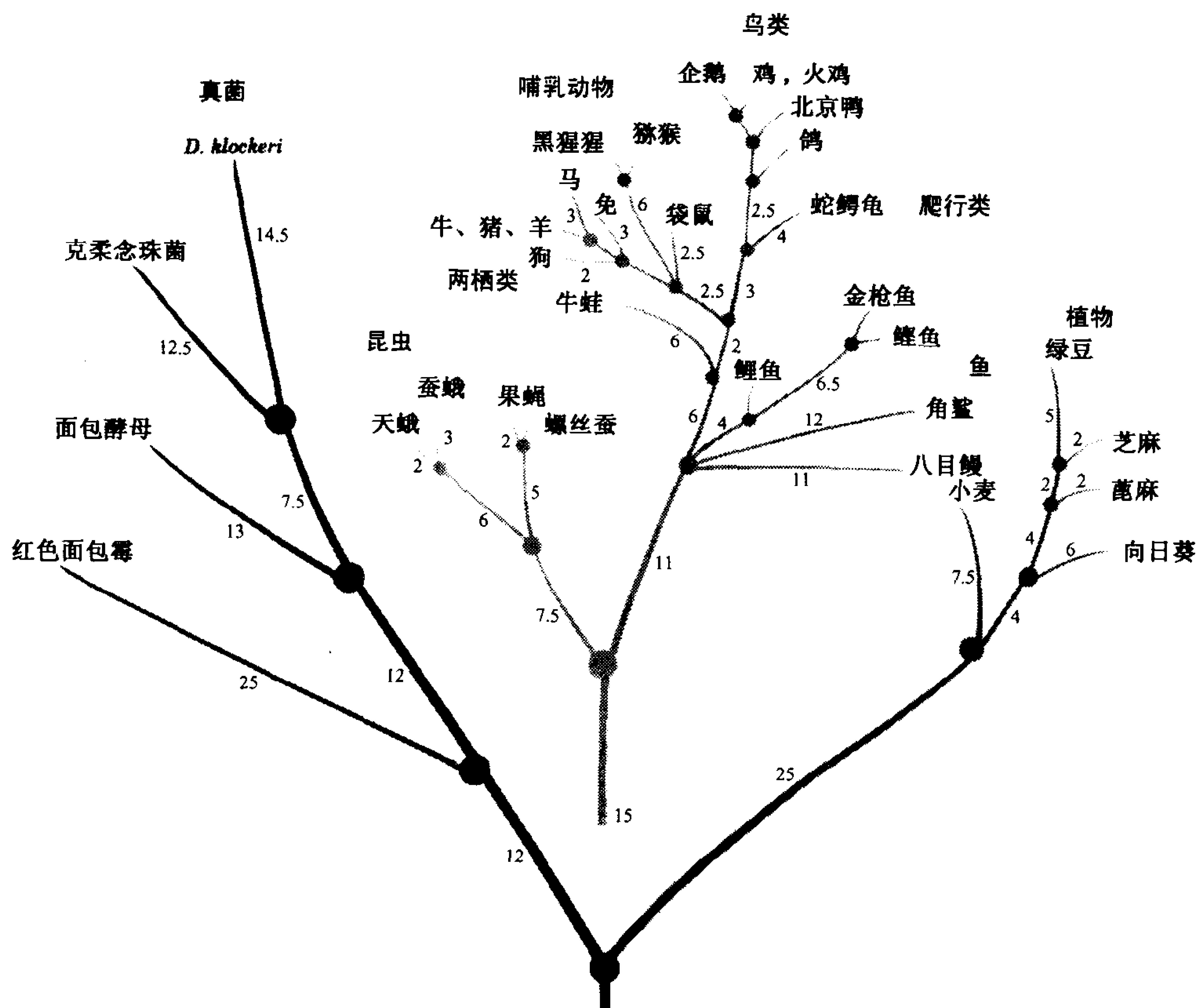


图 5-18 细胞色素 c 的进化系统树

每个枝节点都代表其上面的物种的原始祖先。每枝旁边的数字表示间或物种间，细胞色素 c 枝节点，每 100 个残基中的差异数。[引自 Dayhoff, M.O., Park, C.M., and McLaughlin, P.J., in Dayhoff, M.O.(Ed.), Atlas of Protein Sequence and Structure, p.8, National Biomedical Research Fourdation (1972)]

蛋白质以特征速率进化

可以用蛋白质序列差异对化石记载的物种分化时间作图。给定蛋白的这一曲线是线性的,这表明它的变异积累在一个地理时间区段内,速度是恒定的。然而,选取不同蛋白质,进化速率则不同(图 5-19)。这并不是说编码这些蛋白质的基因变异的速率不同,*只是表明蛋白质变异的速率取决于氨基酸变化对蛋白功能影响的程度*。例如,**组蛋白** H4,在真核细胞中与 DNA 结合(节 23-5A),是一种具有高度保守性的蛋白质(豌豆和奶牛是已分支 12 亿年的物种,然而,在它们组蛋白的 102 个残基中,仅 2 个位点发生了保守性的变化)。显然,对于细胞中包裹 DNA 来讲,组蛋白 H4 是非常重要的,并且极度排斥任何突变。相比较来说,细胞色素 c 就要更多小程度的变异。组蛋白相对较小,并且与其他几个蛋白结合,因此,它的氨基酸序列的任何变化都必须被它的"搭档"所接受。血红蛋白,作为自由移动执行功能的分子,比组蛋白 H4 或细胞色素 c 都要受到更小的选择压力,所以它表面的残基很容易被其他氨基酸所代替。**血纤维蛋白肽**(fibrinopeptide)是一个大约 20 个残基的片段,它是从脊椎动物血细胞中具有凝血作用的**纤维蛋白原**上切下来的。一旦血纤维蛋白肽从纤维蛋白原上切下,它们就没用了,所以它们几乎没有选择压力来维持其氨基酸顺序。

119

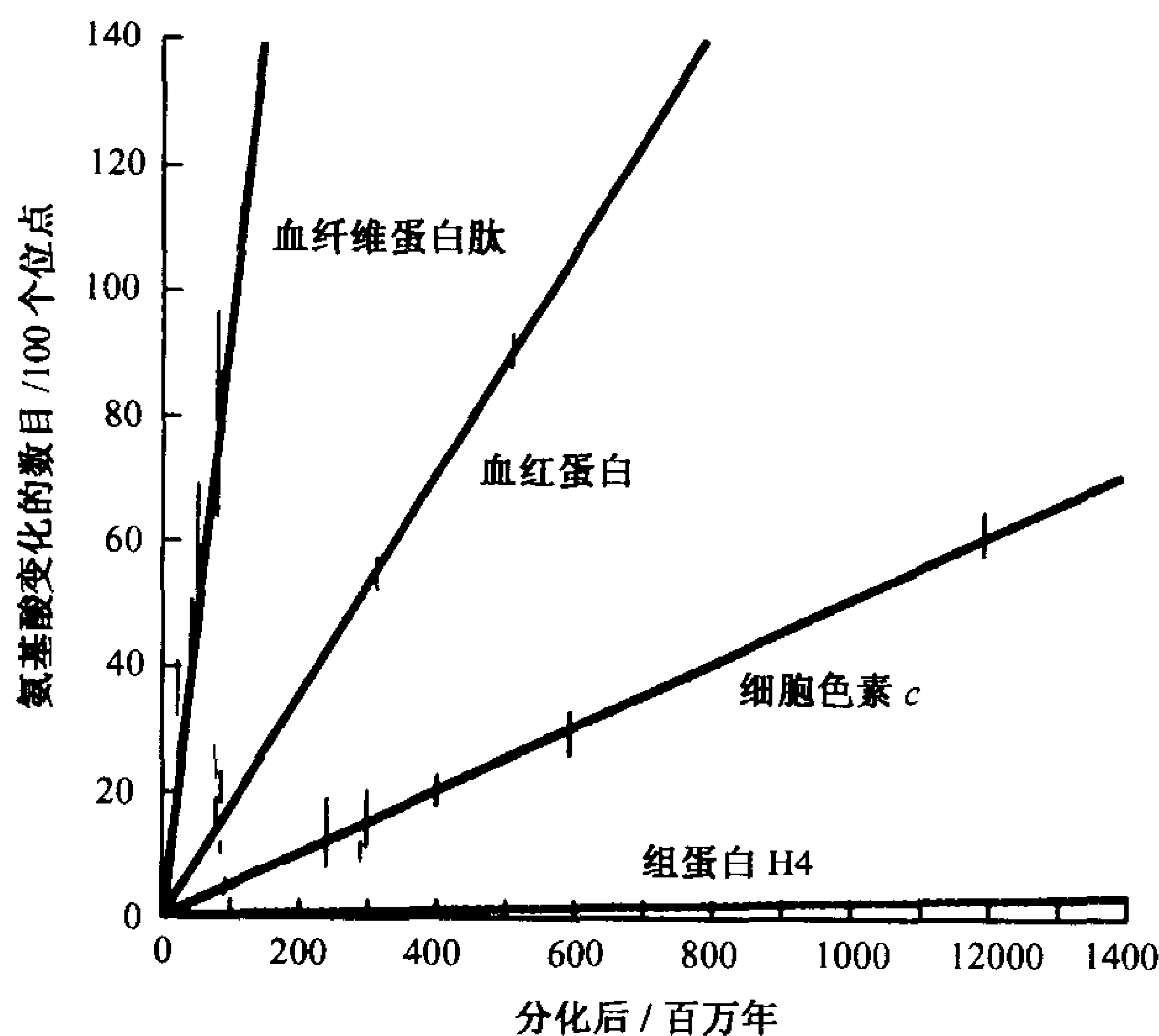


图 5-19　4 种蛋白的进化速率

进化系统树枝点两侧,同源蛋白中氨基酸数目的差异对时间作图,根据化石记录,对应的物种来源于共同的祖先。(引自 Irving Geis)

当然,单靠蛋白质序列不能揭开完整的进化过程。蛋白质序列中微小的变化并不足以解释即使是关系很近的物种间形态特征的不同。这样,虽然平均来说人和黑猩猩的蛋白质有大于 99%是一样的(例如,两者的细胞色素 c 是等同的),但是两者在解剖和行为学上有很大差异,以至于在分类学中被分为两个科。标志物种分化的大的进化步骤也许是由控制基因表达的 DNA 片段的突变所引起,这些突变决定了蛋白表达的多少、表达的时间和部位,以及 DNA 的其他变化如基因重排和重复会产生新的蛋白质,然后由自然选择。

B. 基因重复和蛋白质家族

相似功能的蛋白有相似序列这并不让人吃惊;推测这样的蛋白质是由共同祖先进化而来的。有趣地是,蛋白序列分析表明不同生理功能的蛋白也会有相似的氨基酸序列。事实上,同一生物体中的很多蛋白都有广泛的同源序列。这样的蛋白来自于**基因重复**(gene duplication)——这是一种异常的基因重组事件,在这一过程中一个染色体既有原始基因,又有它的拷贝(基因重组在节 24-6 中讨论)。基因重复是一个特别有效的进化方式,因为通过自然选择,一个基因的拷贝可进化出新功能,而原始基因仍然可以编码执行原始功能的蛋白。

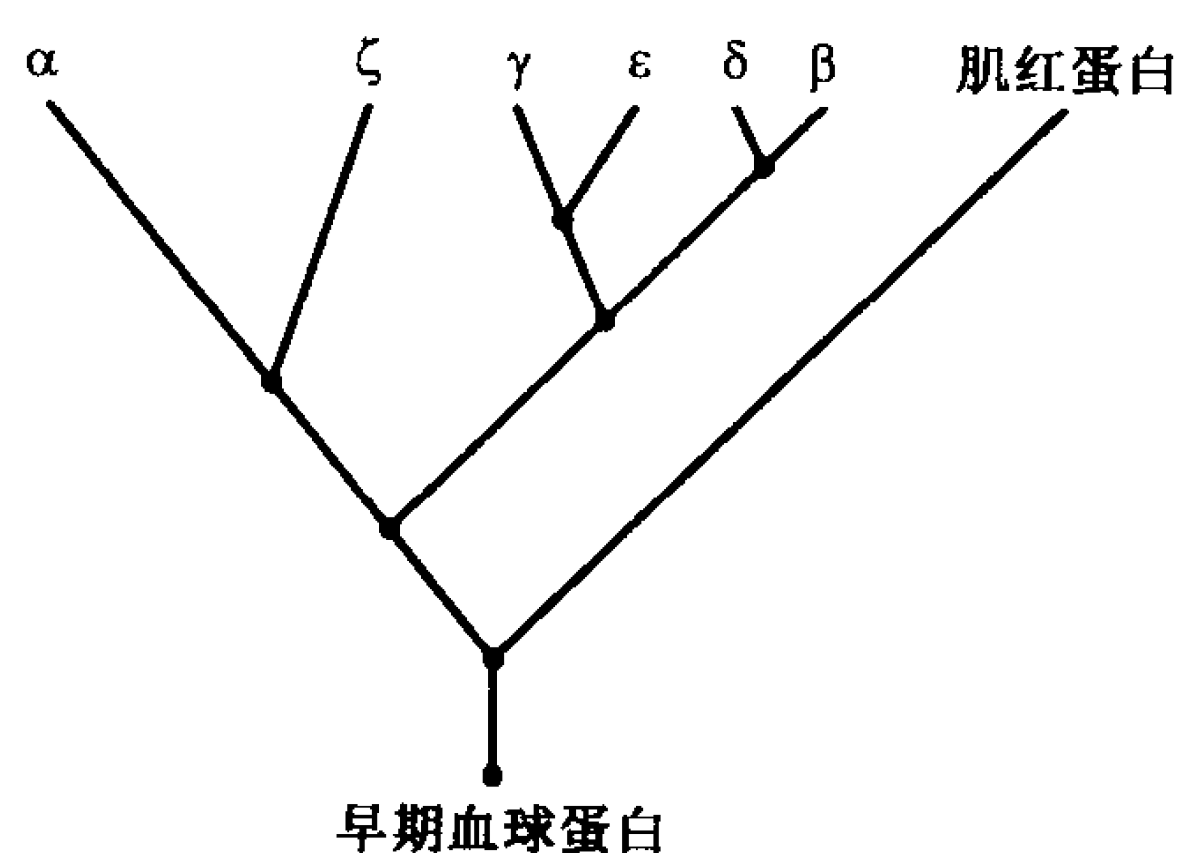


图 5-20 球蛋白家族谱系
每个枝点表示一个基因重复的发生。血红蛋白每种亚基分别用希腊字母表示。

球蛋白家族(globin family)可以提供大量的通过基因重复而进化的例子。转运氧气的血红蛋白是一个带有亚基组成为 $\alpha_2\beta_2$。四聚体 α 和 β 亚基的序列是相似的,并且和**肌红蛋白**(myoglobin)的序列也是相似的。肌红蛋白是肌肉中的贮氧蛋白(在第 7 章将详细讨论血红蛋白和肌红蛋白)。原始的球蛋白是仅有贮氧功能的蛋白。重复使一个球蛋白进化成了单体血红蛋白 α 链。α 链的重复又引出 β 链。球蛋白家族的其他成员有:胎儿血红蛋白四聚体 $\alpha_2\gamma_2$ 中的 γ 链(与 β 链相像),胚胎发育早期血红蛋白含四聚体 $\varepsilon_2\zeta_2$ 中的 ζ 链(与 α 链相像)和 ε 链(与 β 链相像)。成人血红蛋白中仅有不到 1% 的可能性含有 δ 链(与 β 链相像)。尽管对 $\alpha_2\delta_2$ 的血红蛋白并不知其功能,但也许它将最终进化成一种蛋白。球蛋白家族成员谱系如图 5-20 所示。人类基因组中也包括不能表达的球蛋白基因(节 27-1B)。这些**拟基因**(pseudogene)被认为是蛋白进化的终止末端。

C. 蛋白质单元

基因重复不是产生新蛋白质的惟一机制。蛋白质序列分析显示许多蛋白质都是序列模块或**单元**(module)的嵌合体。这些单元大约有 40～100 个氨基酸残基左右。在一些大分子蛋白中,一个单个单元会重复很多次(图 5-21a);其他一些蛋白质包含许多不同的单元。一些参与凝血过程的蛋白质由一组小的单元蛋白组成(图 5-21b)。单元之间不具有序列同源性,因为一个蛋白的序列与其他序列的进化是独立的。各个单元的功能并不总是清楚的:某些明显具有独立的活性,例如催化某种类型的化学反应或者结合特定分子,但是其他的仅仅是起间隔或骨架支撑作用。

因为单元移位产生的新基因比重复整个基因产生新基因的过程要快得多,并且不受时间上的限制。尽管如此,两个机制在物种进化过程中都起了重要作用。在生物体中,出现全新序列的蛋白是非常罕见的,大多数蛋白是其他蛋白质的变异或是其中的一部分。

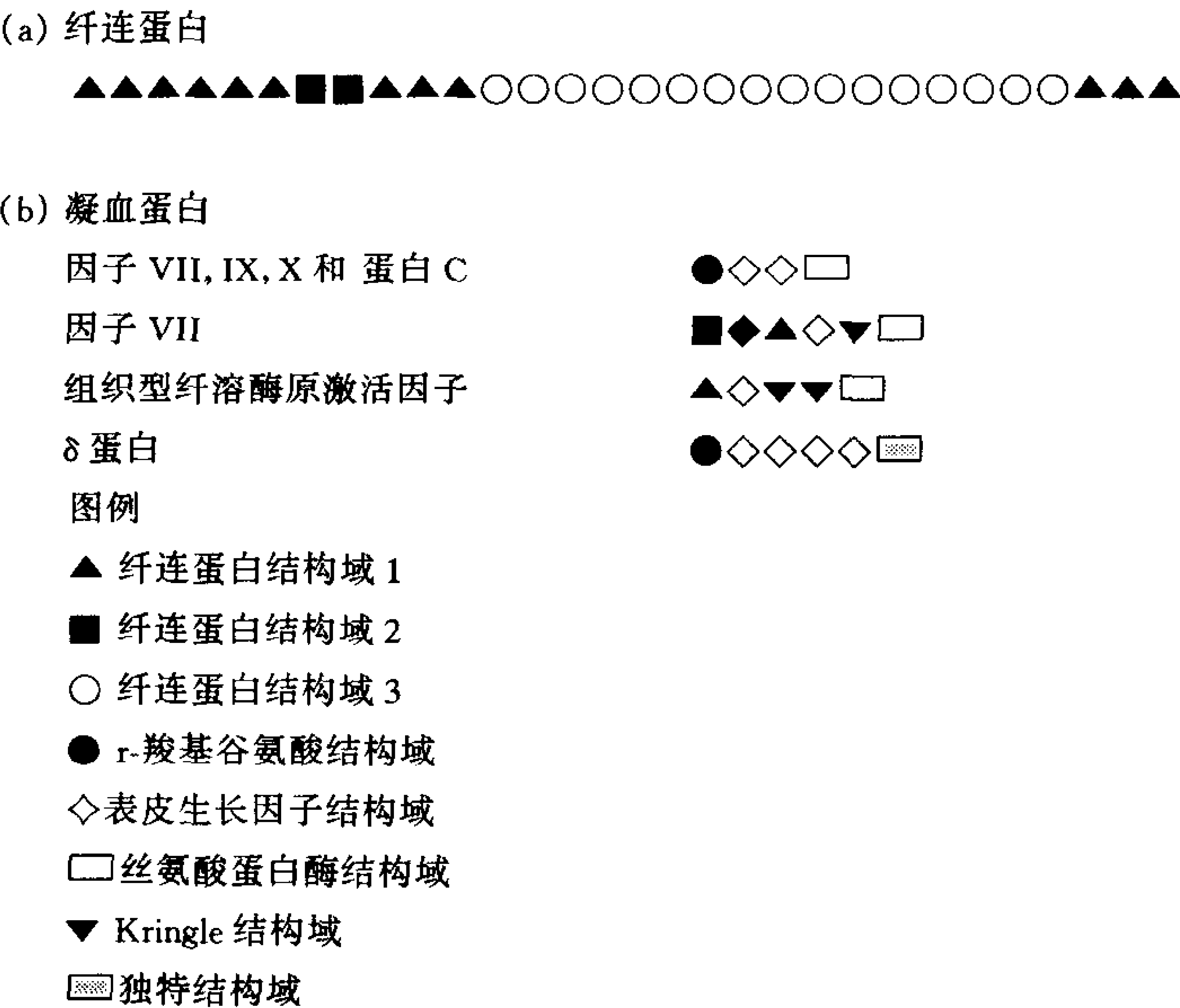


图 5-21　一些蛋白质的单元组成

每个形状都代表一个约 40～100 残基大小的片段。在同一蛋白或一组有联系的蛋白中，一些序列多次变化。(a)纤连蛋白是由三种单元重复组成。(b)参与凝血的特殊蛋白是由一系列小单元组成。表皮生长因子结构域的命名是因为首次发现它是表皮生长因子的组分。[引自 Baron, M., Norman, D.G., and Campbell, I.D., Trends Biochem. Sci. 16, 14(1991)]

小　　结

1. 蛋白质的性质很大程度上取决于组成它的多肽链的大小和序列。
2. 纯化蛋白质的分级分离方法建立在溶解度、带电量和结合特异性的基础上。
3. 纯化后的蛋白质必须保持稳定。
4. 利用溶解度的不同，通过盐析可以浓缩和纯化蛋白质。
5. 色谱层析，依靠可溶性分子在固定相基质上迁移率的不同将它们进行分离，是一种利用电荷(离子交换层析)、疏水作用(疏水作用层析)、分子大小(凝胶过滤层析)和特异性结合(亲和层析)来纯化蛋白质的技术。通常依靠改变盐浓度和 pH 值来进行结合和洗脱。
6. 电泳利用分子所带电荷与大小来分离分子；SDS-PAGE 主要利用分子大小来分离分子。
7. 超速离心利用蛋白质相对分子质量来分离蛋白。
8. 蛋白质序列分析过程，首先测定末端基团来决定不同亚基的数量，然后裂解二硫键。同时还要测定氨基酸组成。
9. 先将多肽裂解成合适大小的片段，然后通过 Edman 降解，每次从 N 末端降解移去一个氨基酸残基。
10. 根据有重叠区域的肽段以及对二硫键的定位，分析得到原始多肽的氨基酸序列。
11. 通过一级结构的改变使蛋白质不断演化。比较不同物种的蛋白质序列可以揭示哪个残基对蛋白结构和功能是必要的。
12. 比较多肽序列也可以揭示物种间的进化关系，以及同一物种的不同蛋白质之间的进化关系。

参考文献

蛋白质纯化

Arakawa, T. and Timasheff, S.N., Theory of protein solubility, *Methods Enzymol.* **114,** 49–77 (1985).

Creighton, T.E. (Ed.), *Protein Structure. A Practical Approach,* IRL Press (1989). [Chapters 1–3 describe various electrophoretic methods. Chapters 6 and 7 discuss amino acid composition and identifying disulfide bonds in proteins.]

Freifelder, D., *Physical Biochemistry: Applications to Biochemistry and Molecular Biology* (2nd ed.), Freeman (1982). [Chapters 6, 8, 9, 11, and 14 include the theoretical underpinnings and practical applications of autoradiography, chromatography, electrophoresis, sedimentation, and spectroscopy, respectively.]

Hames, B.D. and Rickwood, D. (Eds.), *Gel Electrophoresis of Proteins. A Practical Approach* (2nd ed.), IRL Press (1990).

Scopes, R., *Protein Purification: Principles and Practice* (3rd ed.), Springer-Verlag (1994).

Wilson, K. and Walker, J.M. (Eds.), *Principles and Techniques of Practical Biochemistry,* Cambridge University Press (1994). [Includes reviews of centrifugation, spectroscopy, electrophoresis, and chromatography.]

蛋白质测序

Benson, D.A., Boguski, M.S., Lipman, D.J., Ostell, J., and Ouellette, B.F., GenBank, *Nucleic Acids Res.* **26,** 1–7 (1998). [Describes how protein and nucleic acid sequences can be retrieved from databases.]

Blackman, D.S., *The Logic of Biochemical Sequencing,* CRC Press (1994). [Question-and-answer format that provides an overview of strategies and techniques for sequencing proteins and nucleic acids.]

Findlay, J.B.C. and Geisow, M.J. (Eds.), *Protein Sequencing. A Practical Approach,* IRL Press (1989).

Gallop, M.A., Barrett, R.W., Dower, W.J., Fodor, S.P.A., and Gordon, E.M., Application of combinatorial technologies to drug discovery. 1. Background and peptide combinatorial libraries, *J. Med. Chem.* **37,** 1233–1251 (1994).

Sanger, F., Sequences, sequences, sequences, *Annu. Rev. Biochem.* **57,** 1–28 (1988). [A scientific autobiography that provides a glimpse of the early difficulties in sequencing proteins.]

蛋白质进化

Doolittle, R.F., The multiplicity of domains in proteins, *Annu. Rev. Biochem.* **64,** 287–314 (1995). [Summarizes the theory of domain shuffling.]

Doolittle, R.F., Feng, D.-F., Tsang, S., Cho, G., and Little, E., Determining divergence times of the major kingdoms of living organisms with a protein clock, *Science* **271,** 470–477 (1996). [Demonstrates how protein sequences can be used to draw phylogenetic trees.]

关 键 词

一级结构　primary structure

流动相　mobile phase

放射自显影　autoradiograph

限制性蛋白水解　limited proteolysis

肽　peptide

固定相　stationary phase

SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳　SDS-PAGE

Edman 降解法　Edman degradation

亚基　subunit

高效液相层析　HPLC

毛细管电泳　cpaillary electrophoresis

达尔文进化论　Darwinian evolution

多亚基蛋白　multisubunit protein

离子交换层析　ion exchange chromatography

超速离心　ultracentrifugation

同源蛋白　homologous proteins

变性　denaturation

阴离子交换剂　anion exchanger

沉降系数(S)　Svedberg(S)

保守性置换　conservative substitution

核酸酶　nuclease

阳离子交换剂　cation exchanger

分析型超速离心　analytical ultracentrifuge

不变残基　invariant residue

蛋白酶　protease

聚电解质　poly electrolyte

制备型超速离心　preparative ultracentrifuge

高变残基　hypervariable residue

测定　assay

洗脱　elution

密度梯度　density gradient

中性漂移　neutral drift

偶联酶促反应　coupled enzymatic reaction

洗脱液　eluant

区带超速离心　zonal ultracentrifugation

系统进化树　phylogenetic tree

免疫测定法　immunoassay

疏水作用层析　hydrophobic interaction chrom atogra-

phy

平衡密度梯度离心　equilibrium density gradient centrifugation

基因重复　gene duplication

抗体　antibody

凝胶过滤　gel filtration

末端基团分析　end group analysis

拟基因　pseudogene

抗原　antigen

亲和层析法　affinity chromatography

内肽酶　endopeptidase

单元　module

放射免疫测定　RIA

配体　ligand

羧肽酶　carboxypeptidase

酶联免疫吸附测定　ELISA

免疫亲和层析法　immuno affinity chromatography

氨肽酶　aminopeptidase

分级分离程序　fractionation procedure

免疫印迹　immunoblot (Western blot)

外肽酶　exopeptidase

盐溶　salting in

硫醇　mercaptan

盐析　salting out

氨基酸组成　amino acid composition

层析法　chromatography

学习思考题

1. 按照它们在蛋白中的含量的多少顺序,列举出20种氨基酸。
2. 列举影响纯化蛋白稳定的因子。
3. 请列举出利用下列分子特性:电荷、极性、大小和特异性的分离技术。
4. 离子交换层析与亲和层析有哪些区别?
5. 通过超速离心可以获得什么信息?
6. 如何鉴定N和C末端的残基?
7. 蛋白质测序前,为什么要断裂二硫键?
8. 测序前知道蛋白质氨基酸组分有什么帮助?
9. 叙述Edman降解法的步骤。
10. 列举一些实验室自动分析程序的优点。
11. 比较不同生物体的蛋白质序列,可以得到什么信息?
12. 进化系统树是如何构建的?

练　习　题

1. (a)在pH6的羧甲纤维柱中,Arg、His和Leu洗脱顺序是什么样?

   (b)在pH8的二乙氨乙基纤维柱中,Glu、lys和Val洗脱顺序是什么?
2. 下面哪一条多肽链在280nm有更大的吸光值?

   A. Gln-Leu-Glu-Phe-Thr-Leu-Asp-Gly-Tyr

   B. Ser-Val-Trp-Asp-Phe-Gly-Tyr-Trp-Ala
3. 一种蛋白利用凝胶过滤,确定分子质量为90kDa,而利用SDS-PAGE,在有巯基乙醇的条件下,确定的分子质量为60kDa,请问哪一个更准确?
4. 通过下面信息确定一个蛋白的亚基组成:

   凝胶层析确定分子质量:200kDa。

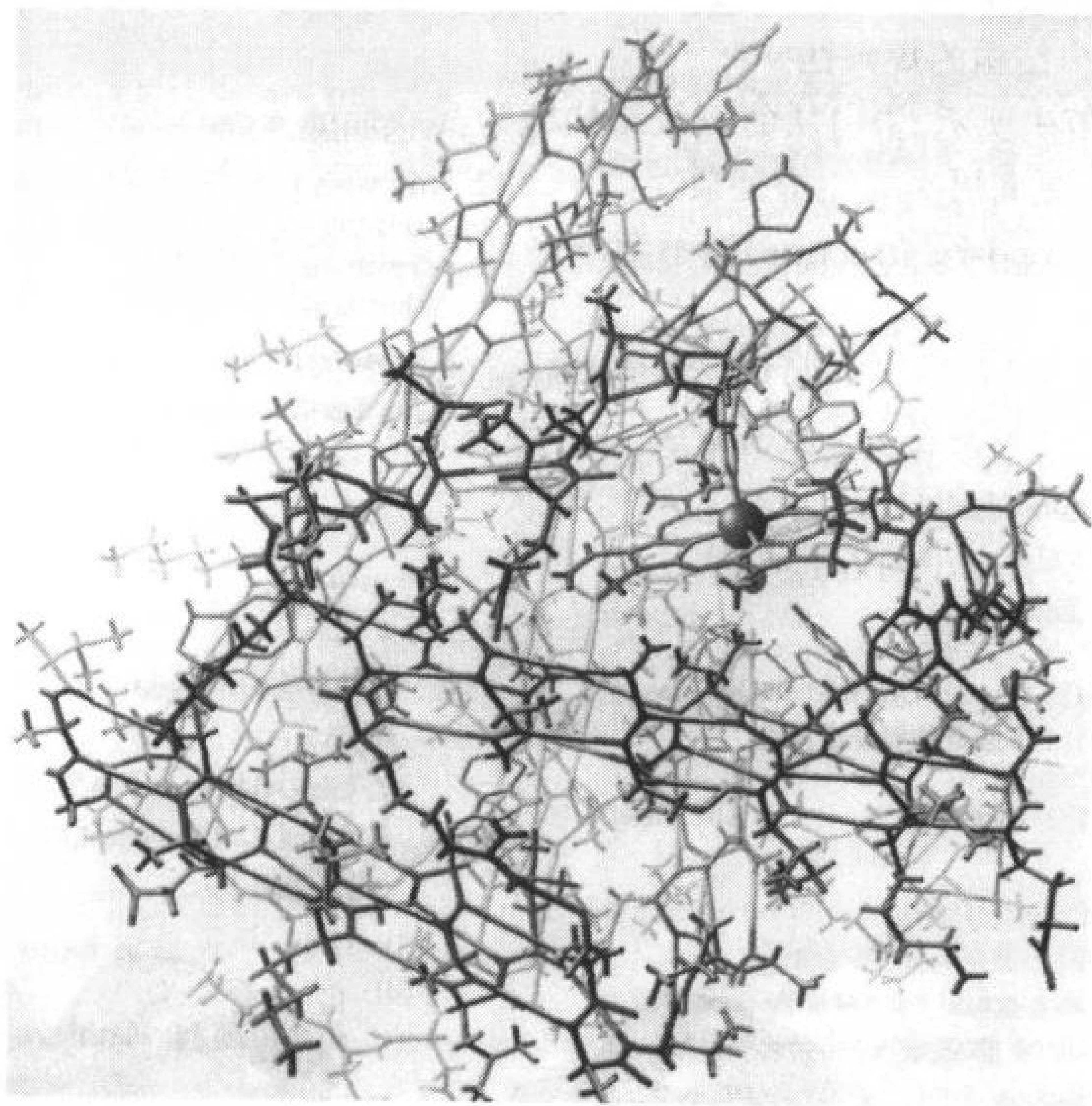
   SDS-PAGE确定分子质量:100kDa

   加巯基乙醇的SDS-PAGE确定分子质量:40kDa和60kDa。

5. 为什么一种蛋白在 0.1mol·L^{-1} NaCl 溶液中超速离心时沉降系数为 2.6S，而在 1mol·L^{-1} NaCl 溶液中超速离心时沉降系数为 4.3S?
6. 为什么用丹磺酰氯处理一条经酸水解处理的单链多肽，可以产生好几种丹磺酰-氨基酸?
7. 鉴定用 Edman 降解细胞色素 *c* 得到的第一个氨基酸，细胞色素 *c* 分别来自(a)果蝇，(b)酵母，和(c)小麦菌。
8. 分别用 CNBr 和胰凝乳蛋白酶裂解一条多肽链，所得序列如下。请分析判断原始多肽链的氨基酸序列。
   CNBr 处理：Arg-Ala-Tyr-Gly-Asn Leu-Phe-Met Asp-Met
   胰凝乳蛋白酶：Met-Arg-Ala-Tyr Asp-Met-Leu-Phe Gly-Asn
9. 用巯基乙醇处理一条多肽链得到下面的两条多肽链：
   1) Ala-Val-Cys-Arg-Thr-Gly-Lys-Asn-Phe-Leu
   2) Tyr-lys-Cys-Phe-Arg-His-Thr-Lys-Cys-Ser
   用胰蛋白酶处理同一条多肽链得到的片段有如下组成：
   3) (Ala, Arg, Cys2, Ser, Val)
   4) (Arg, Cys2, Gly, Lys, Thr, Phe)
   5) (Asn, Leu, Phe)
   6) (His, Lys, Thr)
   7) (Lys, Tyr)
   请确定二硫键在原始多肽链中的位置。
10. 氨基酸测序前，为什么要氧化裂解二硫键?
11. 哪一种分离程序可以把蛋白 1 从以下三种蛋白混合物中分离出来，它们的氨基酸组成如下：
    1) 25%Ala, 20%Gly, 20%Ser, 10%Ile, 10%Val, 5%Asn, 5%Gln, 5%Pro
    2) 30%Gln, 25%Glu, 20%Lys, 15%Ser, 10%Cys
    3) 25%Asn, 20%Gly, 20%Asp, 20%Ser, 10%Lys, 5%Tyr
    三种蛋白有相似的大小和 p*I* 值，并且蛋白 1 没有可以获得的抗体。
12. 你打算测定植物 *Brassica nigra* 中一种蛋白酶抑制剂的轻链的氨基酸序列。你分别用胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶处理这条轻链，得到如下片段。那么，轻链的氨基酸序列是什么?
    胰凝乳蛋白酶
    1) Leu-His-Lys-Gln-Ala-Asn-Gln-Ser-Gly-Gly-Pro-Ser
    2) Gln-Gln-Ala-Gln-His-Leu-Arg-Ala-Cys-Gln-Gln-Trp
    3) Arg-Ile-Pro-Lys-Cys-Arg-Lys-Phe
    胰蛋白酶
    4) Arg
    5) Ala-Cys-Gln-Gln-Trp-Leu-His-Lys
    6) Cys-Arg
    7) Gln-Ala-Asn-Gln-Ser-Gly-Gly-Gly-Pro-Ser
    8) Phe-Gln-Gln-Ala-Gln-His-Leu-Arg
    9) Ile-Pro-Lys
    10) Lys

(清华大学　段明星　译　郑昌学　校)

第 6 章　蛋白质:三维结构



肌红蛋白(一种氧结合蛋白)的原子结构棍棒模型。蛋白质的整体构象决定于氨基酸序列,但非共价键的力如何作用于多肽链以稳定其独特的三维原子排列呢?(引自©Irving Geis)

多年以来,人们一直认为蛋白质是由随机结构组成的胶体,而某些结晶蛋白质的酶活性来源于和惰性蛋白质载体相伴的未知物质。1934 年,J.D.Bernal 和 D.C.Hodgkin 发现,**胃蛋白酶**(pepsin)晶体置于 X 射线下会产生一种不连续的衍射斑图。这一结果首次证明胃蛋白酶并不是

无序的胶体，而是构成具有惟一结构的大分子的一种有序原子阵列。

即使较小的蛋白质也含数千个原子，几乎所有这些原子都占据一定的空间位置。1958 年，John Kendrew 报道了第一个蛋白质的 X 射线结构，即抹香鲸肌红蛋白结构。仅离 James Watson 和 Francis Crick 阐明简单而精妙的 DNA 结构(3-2B 节)5 年之后，当时蛋白质化学家们对肌红蛋白结构的复杂性及其明显的无规性感到很失望。回想起来，正是这种无规性对蛋白质实现其多种多样的生物功能是必需的。然而对约 7000 个目前已知结构的蛋白质的比较显示，其实蛋白质在很大程度上表现出结构的规则性。

如我们在 5-1 节中所示，蛋白质的一级结构即为其线性的氨基酸序列。在讨论蛋白质结构时，通常还包含 3 个更高层次的结构复杂性：

- **二级结构**(secondary structure)指不考虑侧链构象时一条多肽链骨架原子的局域空间排列。
- **三级结构**(tertiary structure)指一条完整肽链的三维结构。
- 许多蛋白质由两条或多条肽链组成，这些肽链泛称亚基。蛋白质的**四级结构**(quaternary structure)是指其亚基的空间排列。

蛋白质结构的 4 个层次示于图 6-1。

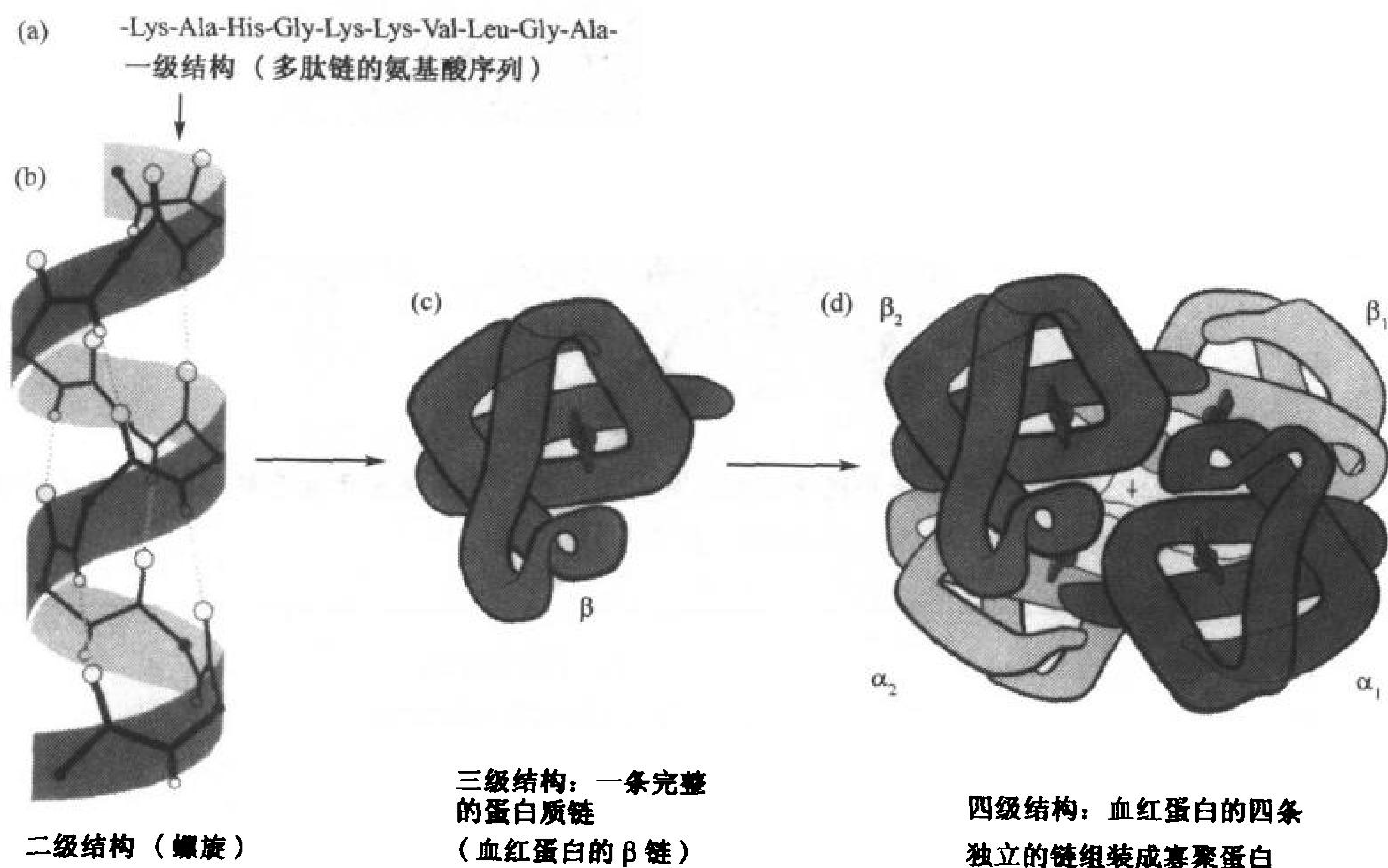


图 6-1 蛋白质结构的层次

(a)一级结构。(b)二级结构。(c)三级结构。(d)四级结构。(引自 Irving Geis)

126

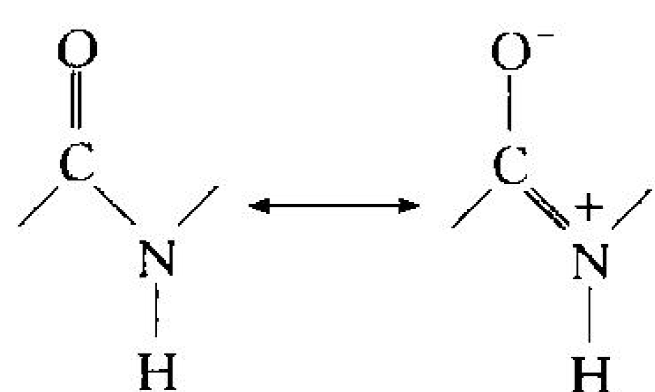
本章将探讨二级结构至四级结构，包括举例说明蛋白质的各结构层次。还将介绍三维分子结构的测定方法并讨论稳定折叠蛋白质的作用力。

1. 二级结构

蛋白质二级结构包括规则的多肽折叠模式如螺旋、折叠和转角。但在讨论这些基本的结构部件之前,我们必须先考虑作为高级结构基础的肽平面的几何性质。

A. 肽平面

20 世纪 30 年代和 40 年代,Linus Pauling 和 Robert Corey 为了阐明多肽链上的构象约束因素,测定了好几个氨基酸和二肽的 X 射线结构,结果表明:由于共振相互作用,肽平面是具有刚性的平面结构,并给肽键带来约 40% 的双键特征:



这个解释得到如下观察结果的支持:肽平面的 C—N 键比其 N—C_α 单键短 0.13Å,而其 C═O键又比醛和酮中的双键长 0.02Å。平面构象使得 π 键重合达到极大,所以肽平面具有刚性构象。

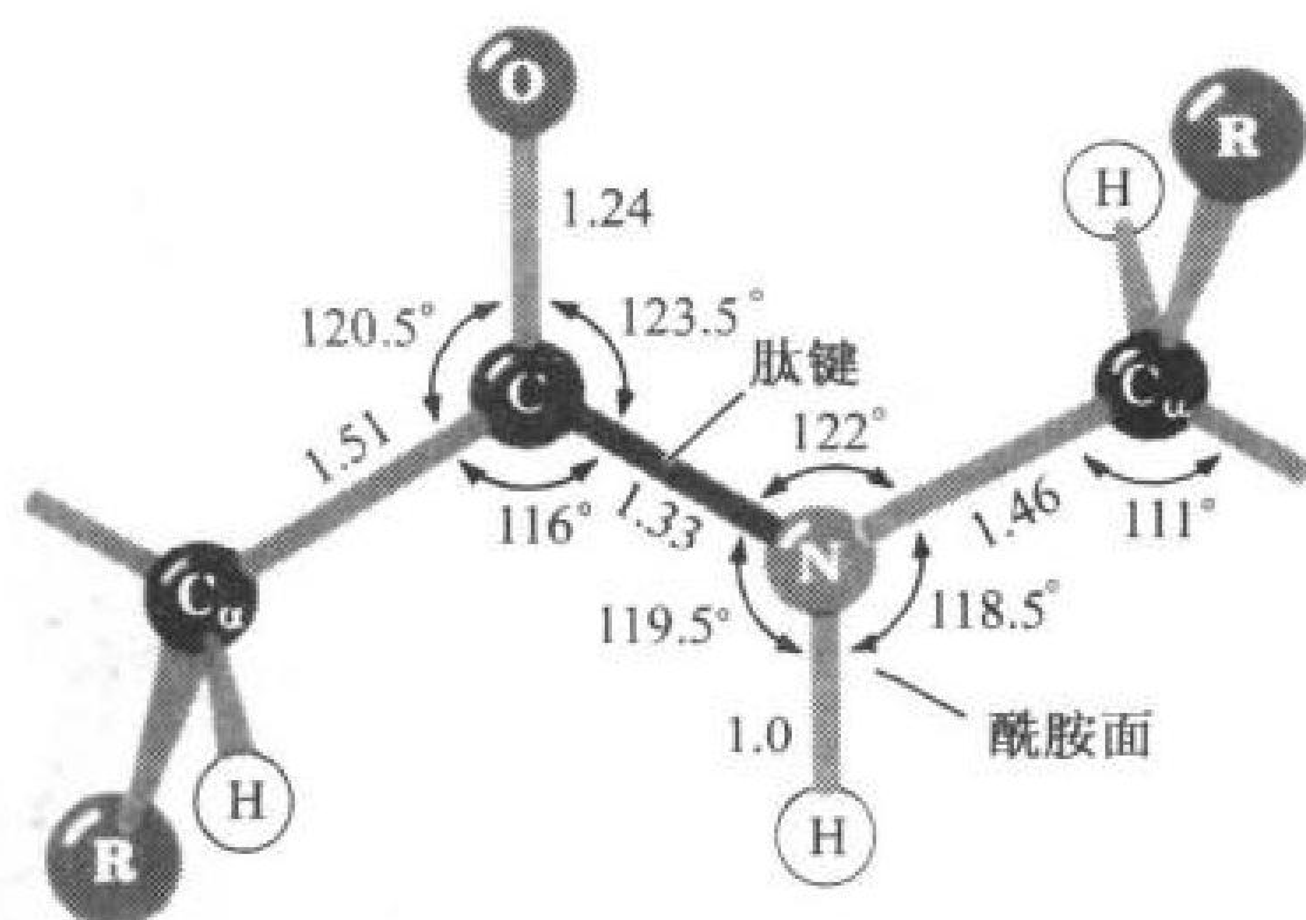


图 6-2　反式肽平面

键长(Å)、键角(度)来自 X 射线晶体结构。[引自 Marsh, R. E. and Donohue, J., Adv. Protein Chem. 22, 249(1967)]

一般地,肽平面几乎总是取**反式构象**(trans conformation),即连续的 C_α 原子分布在连接它们的肽链对侧(图 6-2)。**顺式构象**(cis conformation)中,连续的 C_α 原子位于肽键同侧,由于相邻侧链间的立体位阻,该构象比反式的稳定性低约 8kJ·mol^{-1}。然而,在与脯氨酸残基相接的肽键中,这种立体干扰减小,结果蛋白质中约 10% 的脯氨酸残基取顺式肽键。

描述多肽链构象的肽平面间的扭转角

127

蛋白质的**骨架**(backbone)或**主链**(main chain)指的是除氨基酸残基侧链外的那些参与肽键的原子。骨架可以视为一串相连的刚性肽平面(图 6-3)。这样,主链构象就可以由各残基绕 C_α—N 键 φ 和绕 C_α—C 键 ψ 的**扭转角**(torsion angle,也称**二面角**(dihedral angle)或旋转角)来描

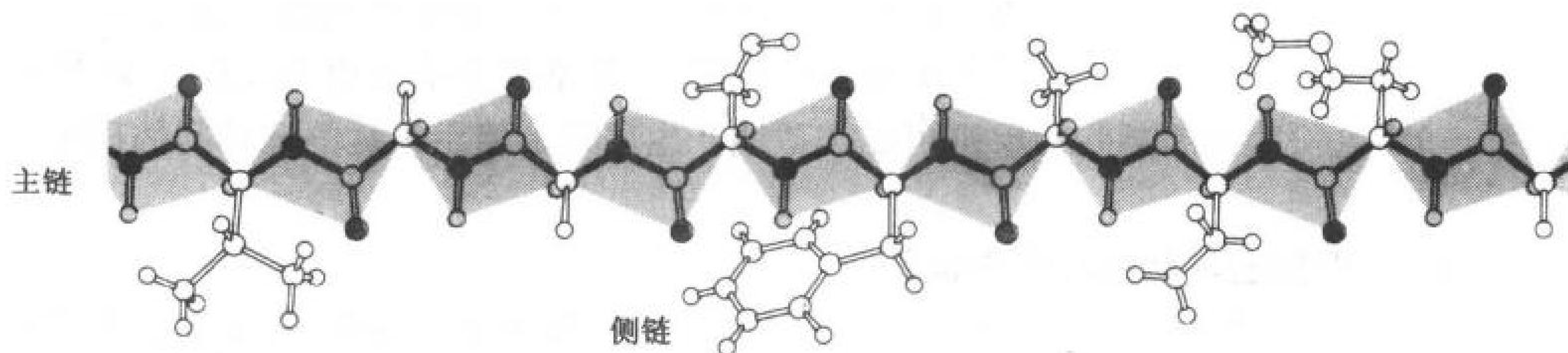


图 6-3　多肽链的伸展构象

骨架表现为一系列的肽平面。(引自 Irving Geis)

述(图 6-4)。当多肽链处于完全伸展构象时,ϕ、ψ 角定义为 180°,且从 C_α 看,顺时针为角度增加方向。

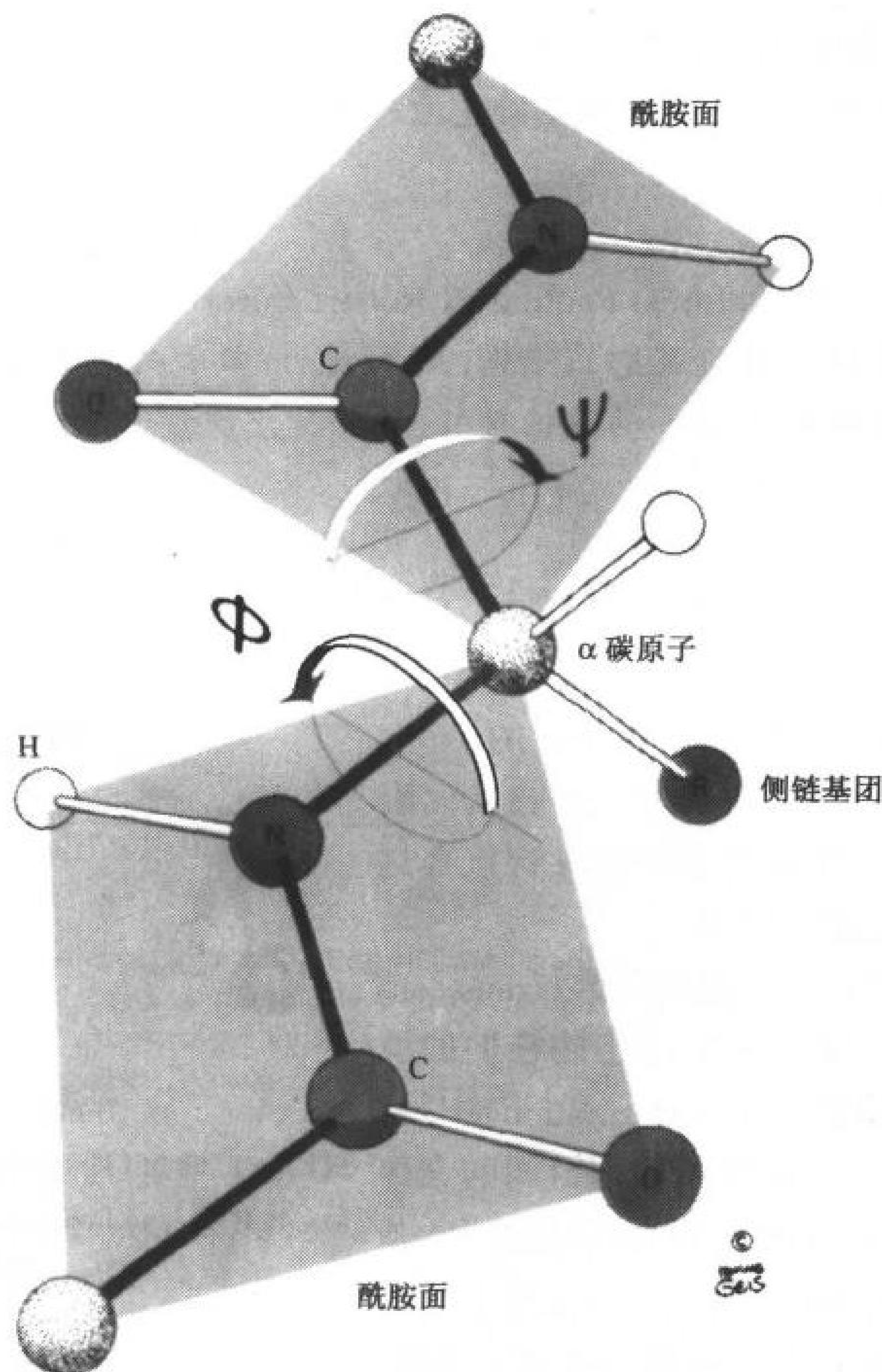


图 6-4　多肽骨架的扭转角

图中显示的是两个肽平面,仅有的合理自由运动是绕 C_α—N 键的旋转(以 ϕ 角度量)和绕 C_α—C 键的旋转(以 ψ 角量度)。按惯例,图中所示的构象,ϕ 和 Ψ 都定义为 180°,且从 C_α 原子看,顺时针为扭转角增大的方向。

(引自 Irving Geis)

一条多肽链骨架的构象自由度,亦即其扭转角,在空间上是受约束的。绕 C_α—N 及 C_α—C 键旋转构成某些 ϕ、ψ 角的组合可能会引起酰胺氢原子、羰基氧原子或相邻残基 C_α 取代物间的碰撞(如图 6-5),更长肽链的某些构象也可能类似地产生序列上相距很远的残基间的碰撞。

Ramachandran 图指出多肽链的允许构象

128

ϕ、ψ 的立体允许值是可以计算的。如图 6-5 所示的立体不允许构象中,其 ϕ、ψ 值使原子间距小于其对应的范德华距离(非共价键原子间的最小接触距离)。这类信息被总结在 **Ramachandran 构象**图中(图 6-6),该图以其发明人 G.N.Ramachandran 的名字命名。

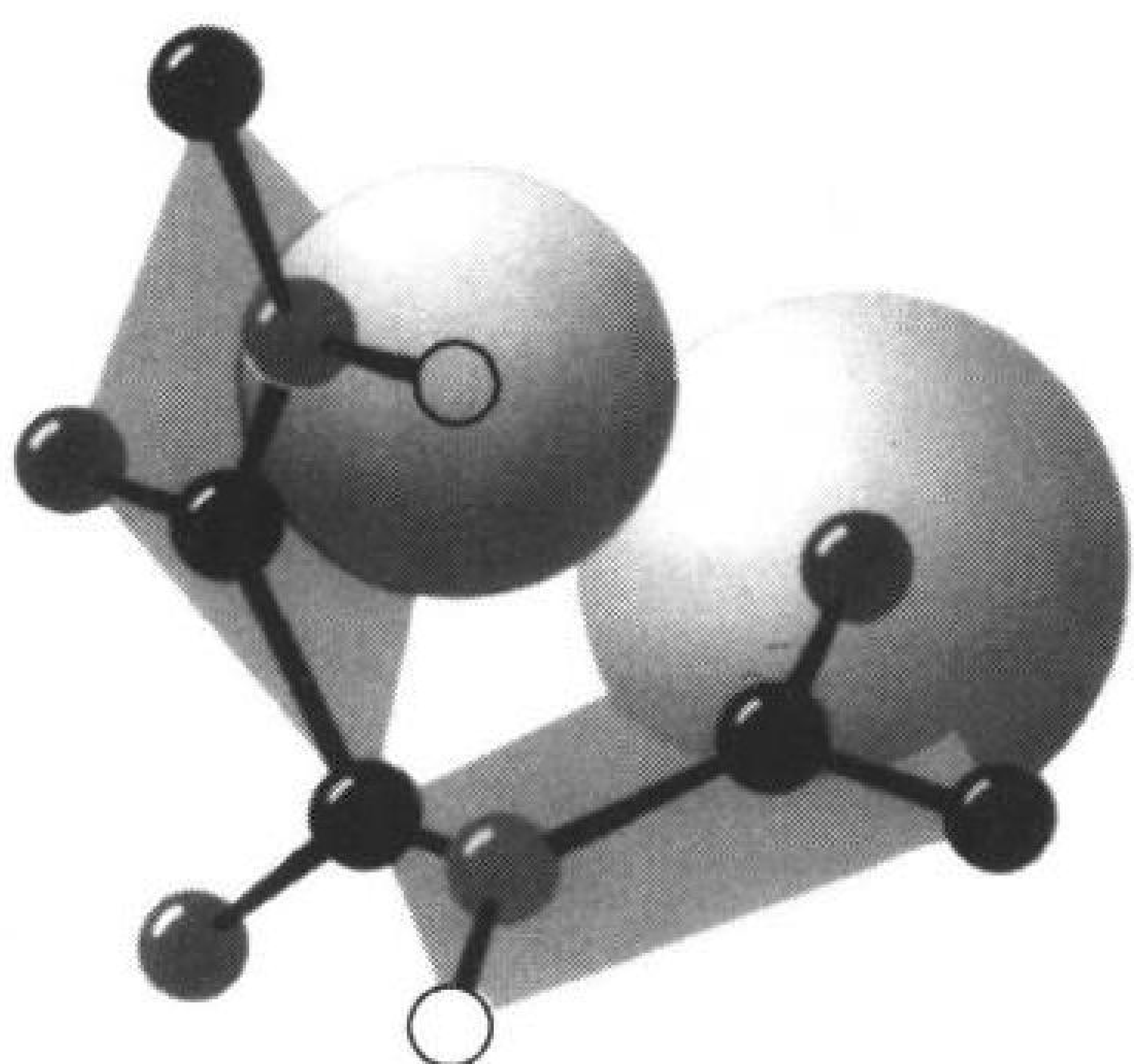


图 6-5 相邻肽平面间的立体位阻

旋转可能引起一个残基上的酰胺氢与下一个残基的羰基氧距离小于范德华距离。(引自 Irving Geis)

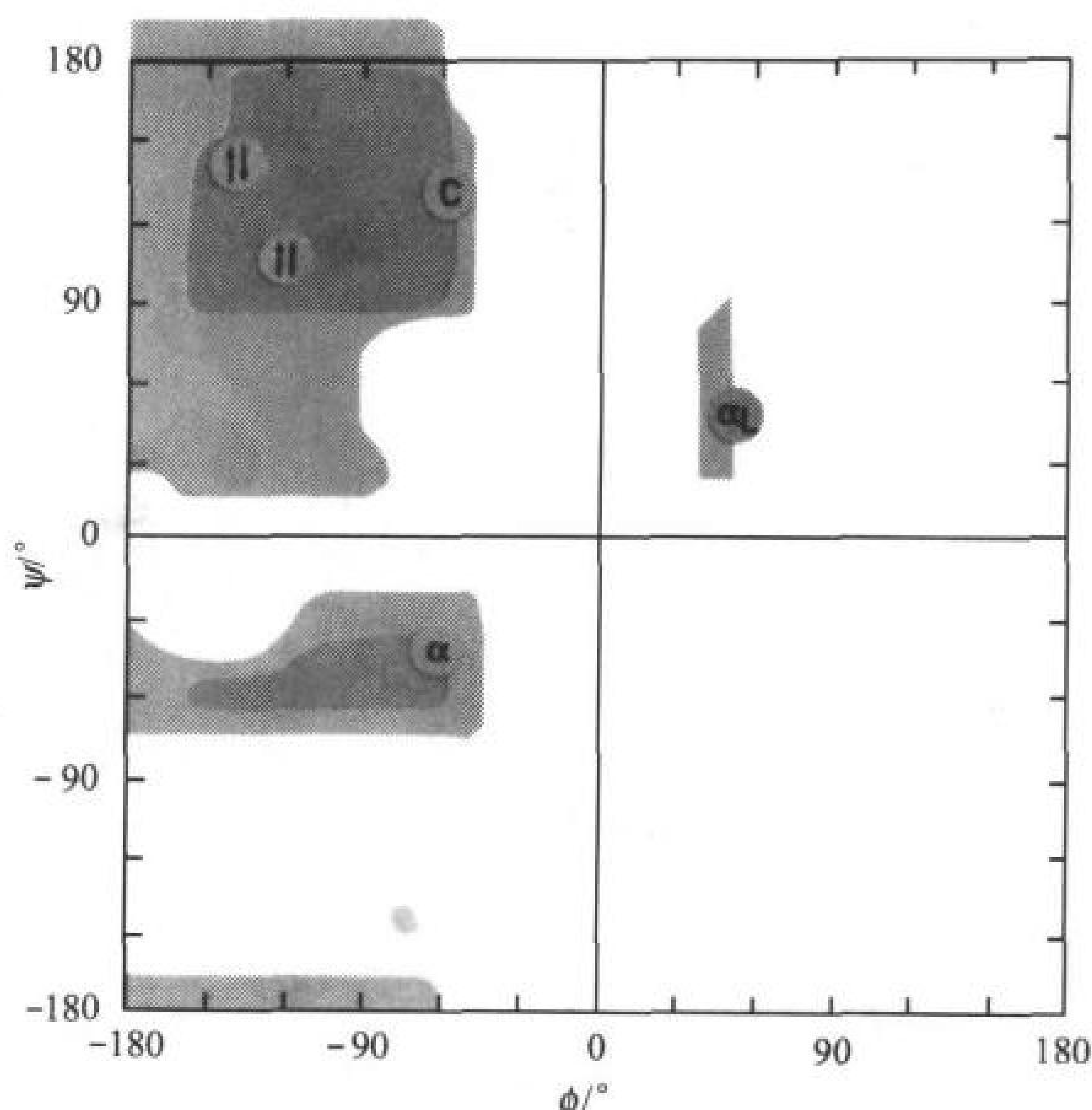


图 6-6 Ramachandran 构象图

绿影区代表除 Gly、Pro 外所有残基的立体允许 ϕ、ψ 角;橙色圆圈代表几种二级结构的构象角:α,右手 α 螺旋;↑↑,平行 β 折叠;↑↓,反平行 β 折叠;C,胶原螺旋;α_L,左手 α 螺旋。

Ramachandran 图中的大部分区域(即大多数 ϕ、ψ 组合)代表肽链不允许构象,仅有三个小区域对大多数残基而言是物理可行的。已精确测定的结构的 ϕ、ψ 值几乎总是落在这些允许区中,但也有一些值得注意的例外:

1) Pro 的环状侧链将 ϕ 值限制在 -60°附近,自然成为构象限制最大的氨基酸残基。
2) Gly,惟一的无 C_β 原子残基,比其他残基的立体障碍小得多,因而其 ϕ、ψ 允许范围覆盖了 Ramachandran 图的一个较大的区域,多肽链上的 Gly 残基常取对其他残基禁止的构象。

B. 规则性二级结构:α 螺旋和 β 折叠

一些蛋白质二级结构元件相当普遍,即使在序列上大不相同的蛋白质中也极易识别,**α 螺旋**(α helix)和 **β 折叠**(β sheet)都是这类元件,它们由具有重复 ϕ、ψ 值的残基序列组成,因而被称为**规则性二级结构**。

α 螺旋

只有一种多肽螺旋既具有有利的氢键键合模式,ϕ、ψ 值又都落在 Ramachandran 构象图的完全允许区中,这就是 α 螺旋,它是 Linus Pauling 于 1951 年通过模型构建发现的,该发现被誉为结构生物化学的一个里程碑。 129

α 螺旋(图 6-7)是右手性的,即当拇指指向螺旋上升方向时(图 3-10),螺旋转向右手卷曲的手指方向。α 螺旋每圈有 3.6 个残基,**螺距**(pitch,螺旋沿轴每上升一圈的距离)为 5.4Å。蛋白质的 α 螺旋平均长度为约 12 个残基,对应三圈多螺旋,长约 18Å。

在 α 螺旋结构中,骨架氢键的形成是由第 n 个残基的羰基 C═O 沿螺旋轴指向第 n+4 个

残基的 N—H 基，形成一个近乎最佳 2.8Å N⋯O 间距的强氢键作用。氨基酸侧链从螺旋中向外伸出指向下方(图 6-8)，从而避免了与多肽骨架的立体干扰以及侧链间的相互干扰。螺旋的核心紧密堆积，即原子间呈范德华接触。

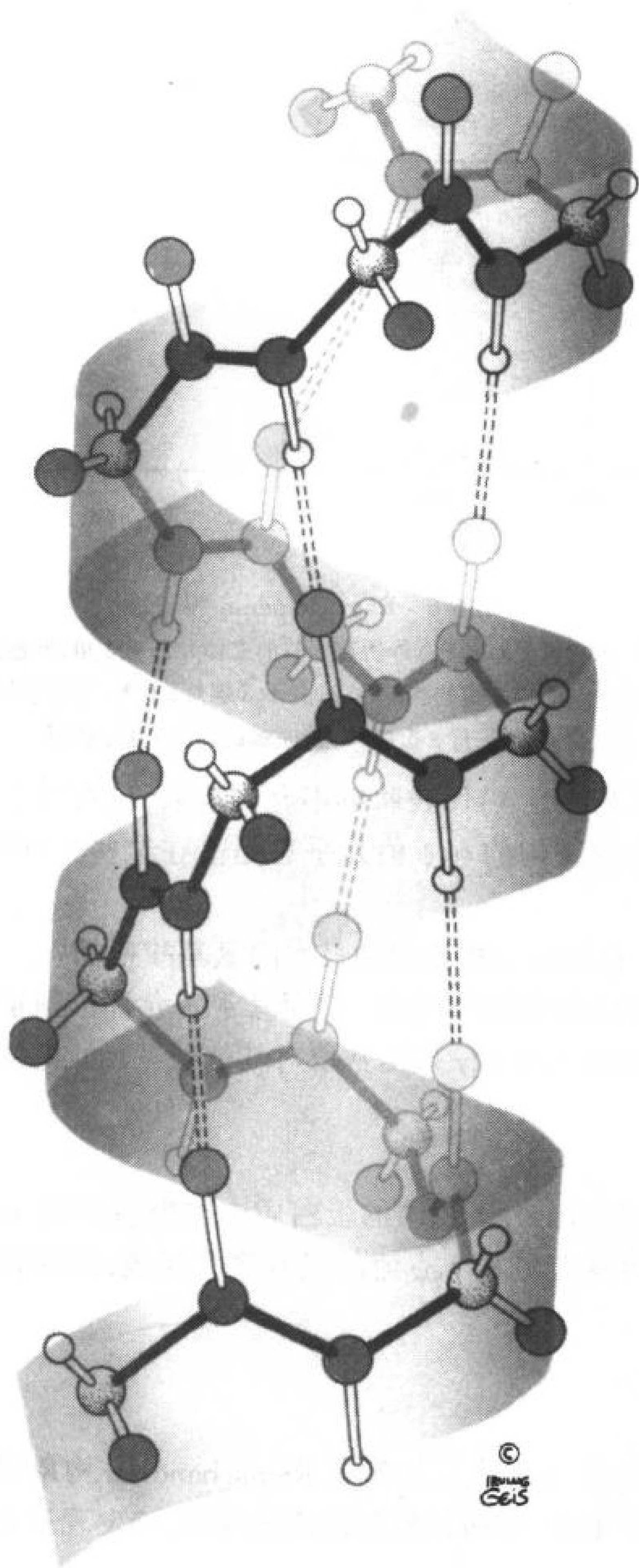


图 6-7　结构的秘诀：α 螺旋

这种右手螺旋每圈 3.6 个残基，虚线代表沿肽链延伸的四个残基的 C═O 基团和 N—H 基团之间的氢键。(引自 Irving Geis)

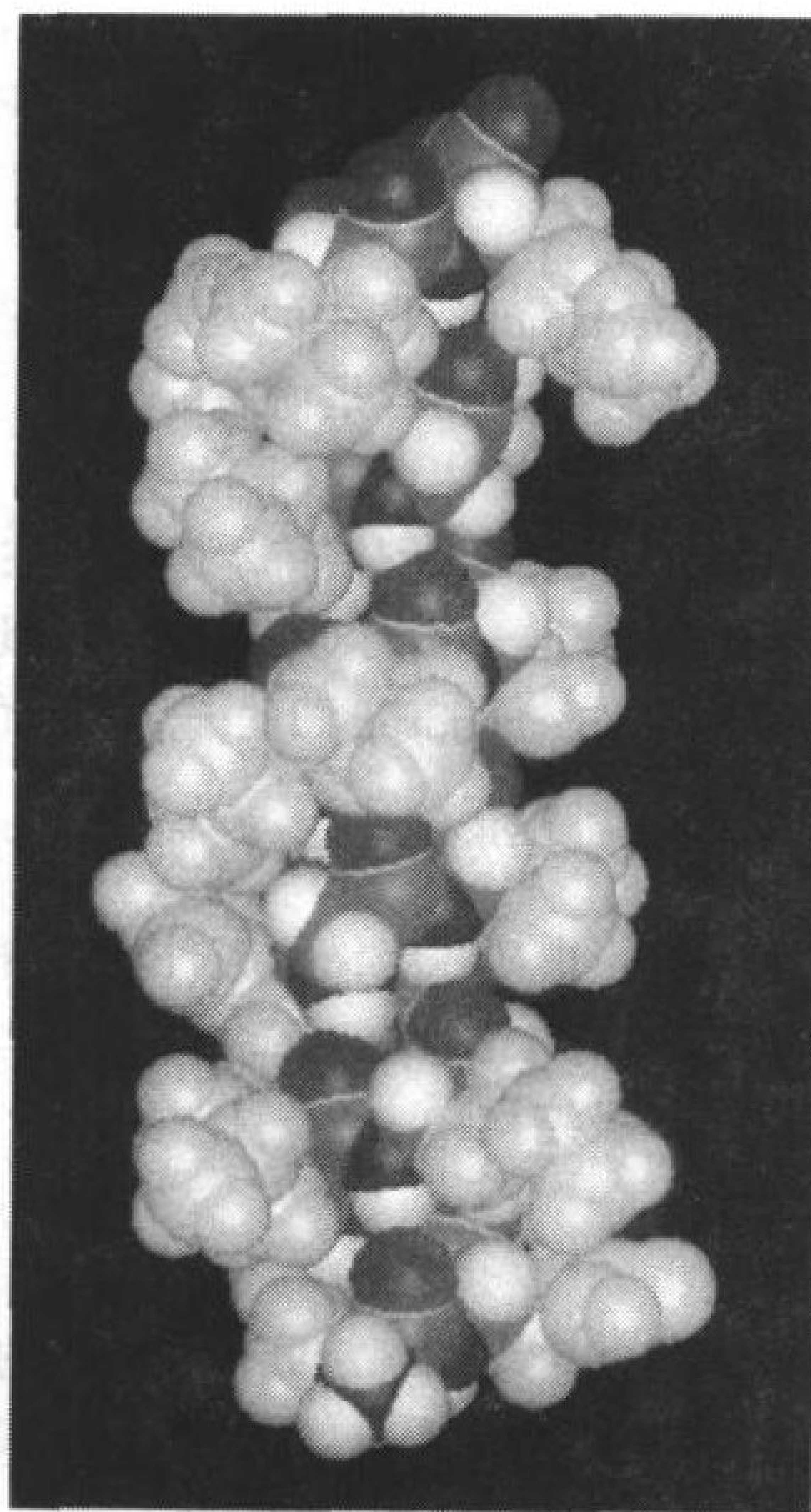


图 6-8　α 螺旋的空间填充模型

骨架原子的颜色为：碳原子绿色，氮原子蓝色，氧原子红色，氢原子白色。侧链(黄色)伸出螺旋。该 α 螺旋是抹香鲸肌红蛋白中的一个片段。

β 折叠

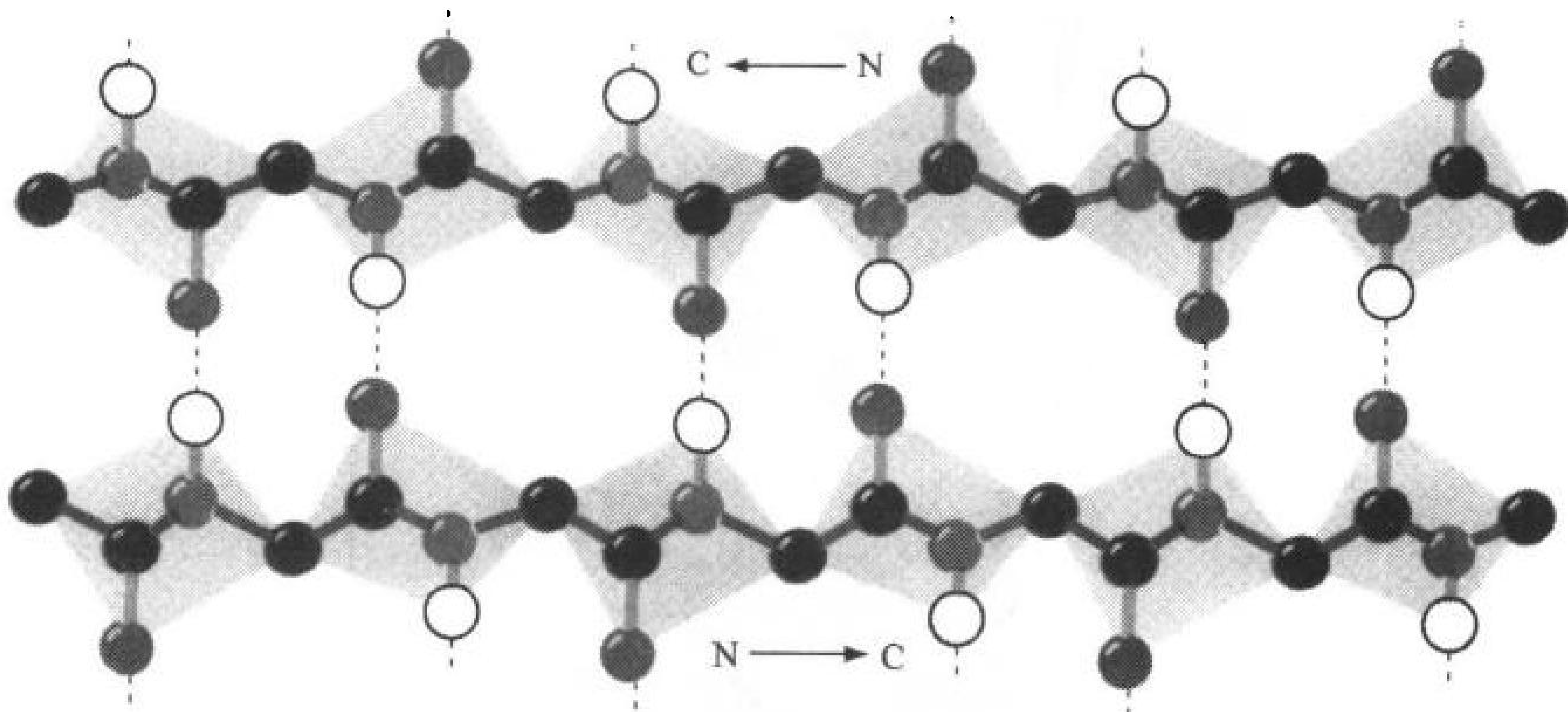
就在 Pauling 于 1951 年提出 α 螺旋结构的同一年，Pauling 和 Corey 还假设了另一种二级结构——β 折叠的存在。和 α 螺旋一样，β 折叠充分利用多肽骨架的氢键结合能力，不同的是，在 β 折叠中，氢键发生在相邻肽链之间，而不像 α 螺旋那样发生在同一条肽链之内。

β 折叠分两类：

1) **反平行 β 折叠**(antiparallel β sheet)，由氢键结合的两相邻肽链沿相反方向延伸(图 6-9a)。

2) **平行 β 折叠**(parallel β sheet)，由氢键结合的两相邻肽链沿相同方向伸展(图 6-9b)。

(a) 反平行



(b) 平行

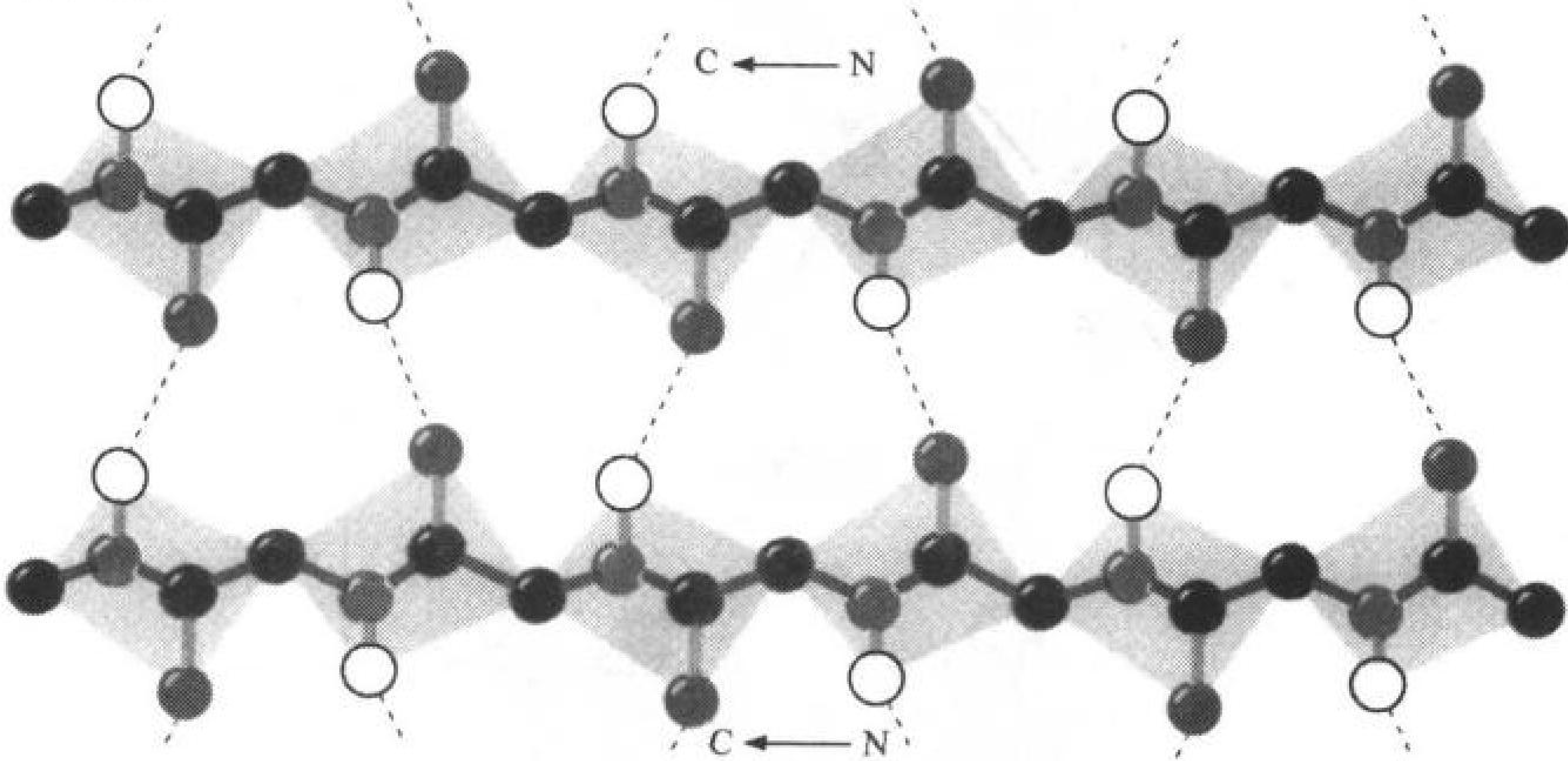


图 6-9 结构的秘诀：β 折叠

虚线代表肽链间的氢键，为清楚起见，省略了侧链。(a)反平行 β 折叠。(b)平行 β 折叠。(引自 Irving Geis)。

这些以最佳氢键键合的 β 结构的构象与图 6-3 所示的完全伸展构象有一定程度的差别，它们呈现波纹或折褶的外观(图 6-10)，因而有时也称它们为“折褶片层”。β 折叠中，多肽链上连续的残基侧链向折叠片两侧反向伸展，两残基重复距离为 7.0Å。

蛋白质中的折叠片含 2 股到 12 股肽链以上，平均含 6 股。每股含残基数可多达 15 个，平均为 6 个。图 6-11 所示为一个 6 股反平行 β 折叠。

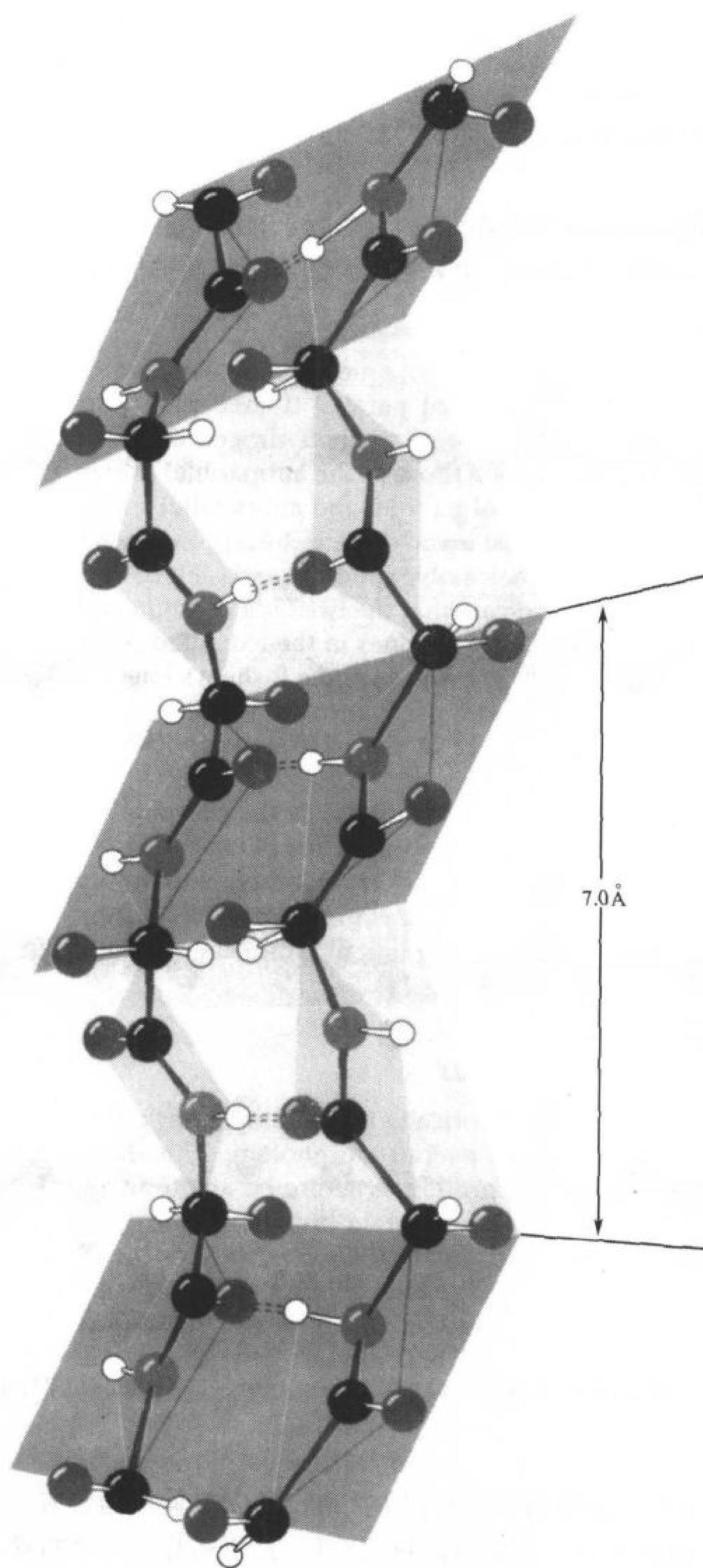


图 6-10　β 折叠的折褶外观
虚线表示氢键。每条肽链上的 R 基团(紫色)交替地伸向折叠片两侧相反的方向并在相邻链上对齐。(引自 Irving Geis)

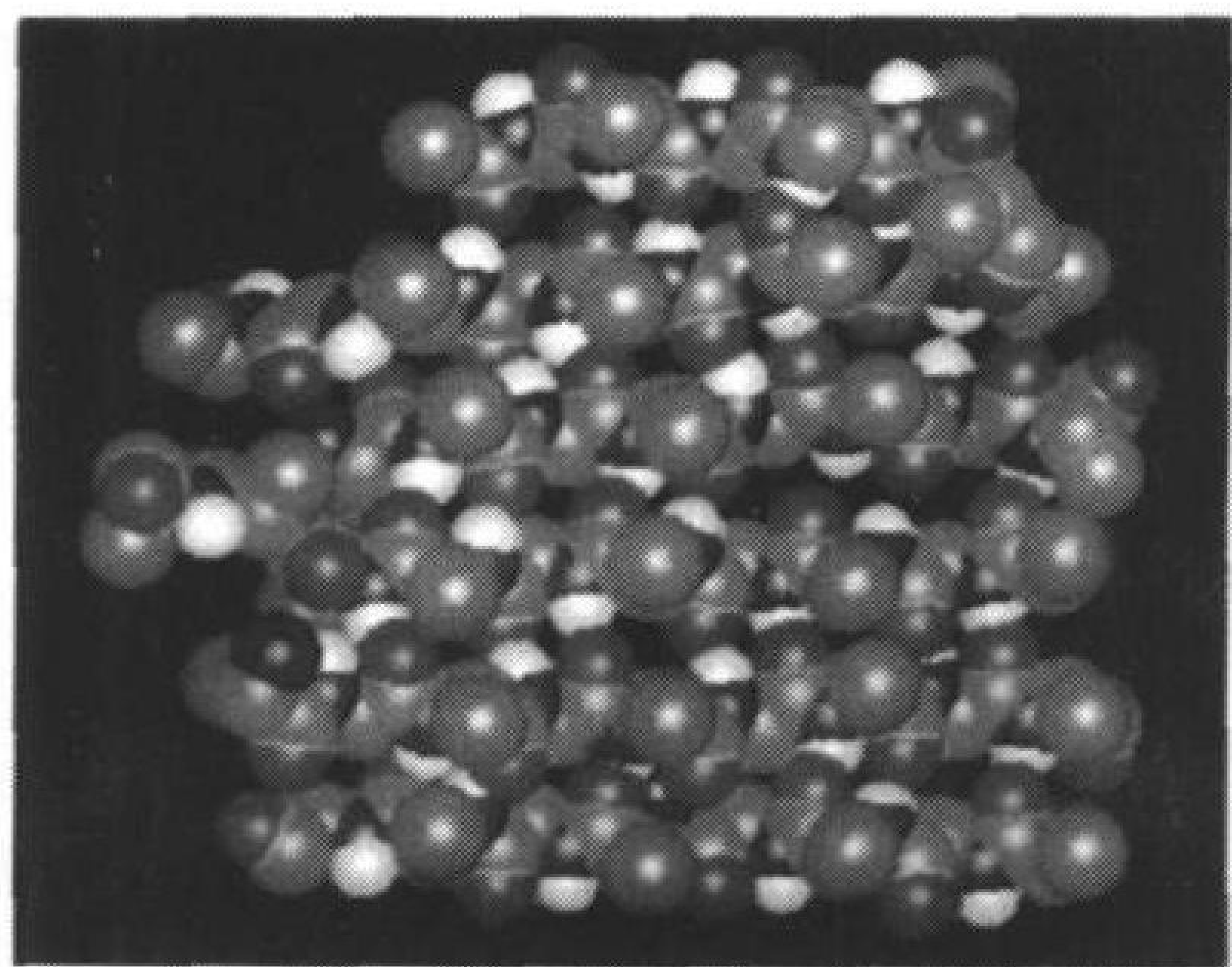


图6-11　β折叠的空间填充模型
主链原子颜色为:碳原子绿色,氧原子红色,氢原子白色。R基团以紫色大球表示。该6股β折叠来自刀豆的刀豆球蛋白A。



图6-12　牛羧肽酶A中的β折叠图
肽链骨架用条带表示,α螺旋画成环绕的圈,β折叠画成指向C端的箭头。图中未显示侧链。这8股β折叠形成一右手扭曲的马鞍形曲面。[引自 Jane Richardson, Duké University]

平行β折叠很少在5股以下,表明平行β折叠不如反平行折叠稳定,可能是由于平行折叠中氢键发生了扭曲(图6-9)。平行与反平行股混合的β折叠较为普遍。

132

β折叠几乎总是呈现一种沿肽链方向的右手扭曲(图6-12)。构象能量计算表明,这种扭曲现象是伸展肽链中手性L-氨基酸残基间相互作用的结果,它使得β折叠的链间氢键变形而减弱。于是,一个特定β折叠的几何结构就成了优化肽链构象能量与保持氢键作用两者间折衷的结果。

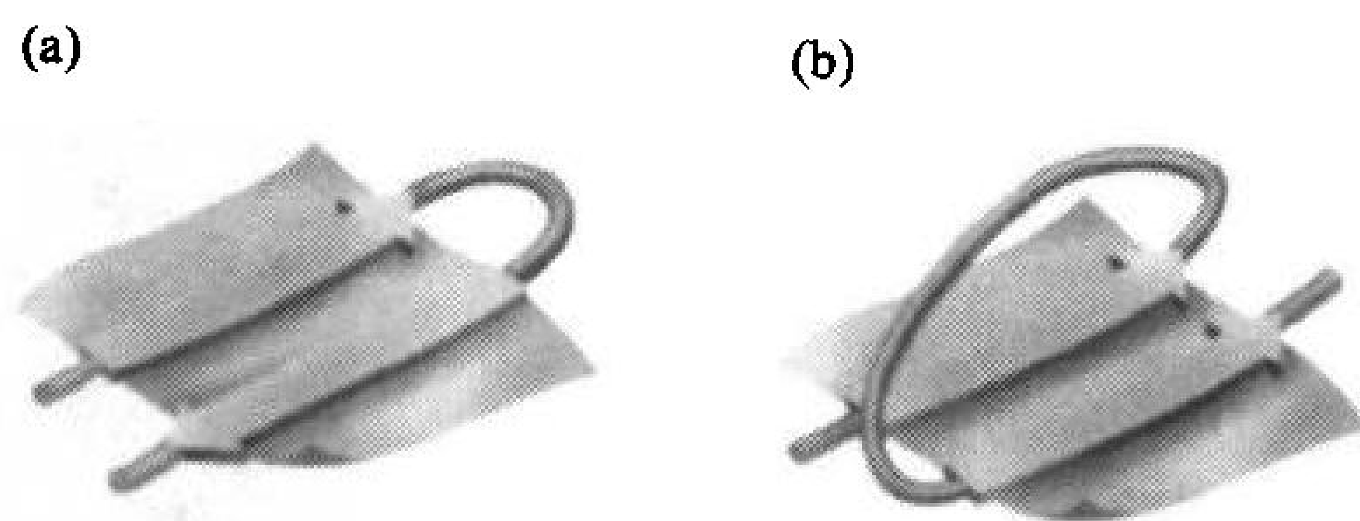


图6-13　β折叠中相邻股间的连接方式
(a)反平行股间可用一个小环来连接。(b)平行股间需要更长的交叉连接。[引自 Richardson, J. S., Adv. Protein Chem. 34,196(1981)]

β折叠中多肽股的**拓扑学**(topology;连接方式)相当复杂。两反平行股之间的连接可以只是一个小环(图6-13a),但平行股之间的连接必须在β折叠平面外进行交叉(图6-13b)。不管是平行或反平行的折叠,都可能以较长的肽链连接并常含有螺旋(图6-12)。

C. 纤维蛋白

历史上蛋白质根据总体形态可分为**纤维蛋白**(fibrous protein)和**球蛋白**(globular protein)。这种简单的二分法是在原子水平上测定蛋白质结构的方法建立之前提出的,这种分类法对同时包含僵直长形纤维区和更紧密、高度折叠球状区的蛋白质并非合适。但这种分类至少还是有助于突出纤维蛋白的性质,纤维蛋白在生命体中常具有保护、连接或支撑的功能。这里我们讨论的3种已知纤维蛋白——角蛋白、丝蛋白和胶原蛋白——都是高度长形的分子,其形状由某个单一的二级结构决定,因而也是这些结构的典型例子。

α 角蛋白——卷曲螺旋

角蛋白(keratin)有机械耐力,化学性质不活泼,它存在于所有高等脊椎动物中,是构成表皮角质层及其相关附着物如毛发、角、指甲和羽毛的主要成分。角蛋白有两种,α 角蛋白存在于哺乳动物中,β 角蛋白存在于鸟类和爬行类动物中。每种哺乳动物约有 30 种角蛋白衍生物,它们以组织特异性方式进行表达。

α 角蛋白的 X 射线衍射图谱与 α 螺旋类似(因此命名为 α 角蛋白),但其螺距为 5.1Å,而不像 α 螺旋为 5.4Å。这种差异是由于两条分别形成 α 螺旋的角蛋白多肽链相互缠绕形成左手卷曲螺旋的结果。在一对螺旋中,每个 5.4Å 正常螺距的 α 螺旋相对于缠绕轴倾斜,表现出所观测到的 5.1Å 的重复距离。这种装配物称为**卷曲螺旋**(coiled coil)结构,因为每条 α 螺旋本身按螺旋规则卷曲。

133

α 角蛋白的卷曲螺旋构象是由其一级结构决定的:每条肽链的中心约 310 残基的片段具有

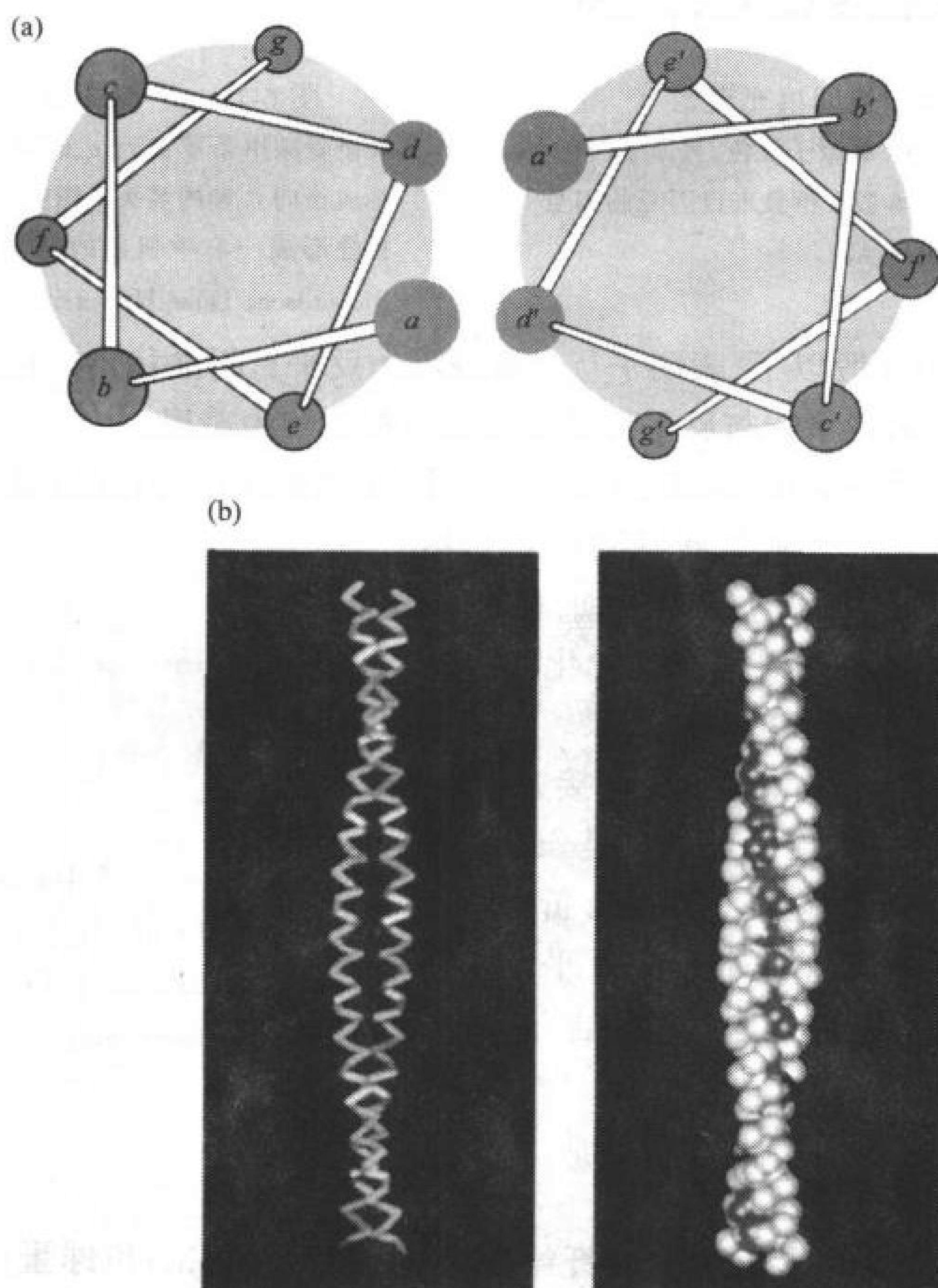


图 6-14 α 角蛋白的卷曲螺旋

(a)沿卷曲螺旋轴可见非极性残基沿 α 螺旋一侧对齐。螺旋具有假重复序列 *a-b-c-d-e-f-g*,其中 *a*、*d* 主要为疏水残基。[引自 Mc Lachlan, A. D. and Stewart, M., J. Mol. Biol. 98, 295 (1975)]。(b)多肽骨架侧视图:走向图(左)及空间填充模型图(右)。请注意接触侧链(空间填充模型中的红色球)的相互整合。(引自 Carolyn Cohen, Brandeis University)

一个 7 残基的假重复，*a-b-c-d-e-f-g*，其 *a*、*d* 两个位置上主要为疏水残基。既然 α 螺旋每圈是 3.6 个残基，那么 α 角蛋白的 *a* 残基与 *d* 残基必定会排在螺旋的同一侧（图 6-14a），形成疏水带，两个螺旋上的疏水带可以相互结合。因为在 α 角蛋白中，每圈螺旋为 3.5 残基的重复周期，比标准 α 螺旋每圈为 3.6 个残基的重复周期稍小，所以角蛋白的两个螺旋之间相互倾斜 18°，形成卷曲螺旋。这种构象允许接触侧链之间相互交错排列。

α 角蛋白的更高级结构还不很清楚。每条肽链的 N 末端和 C 末端结构域有利于卷曲螺旋（二聚体）组装成原丝，两根原丝组成初原纤维（图 6-15），4 条初原纤维构成一根微纤维，再与其他微纤维组成巨原纤维。一根哺乳动物的毛发含有多层死细胞，它们都是用平行巨原纤维包装的。

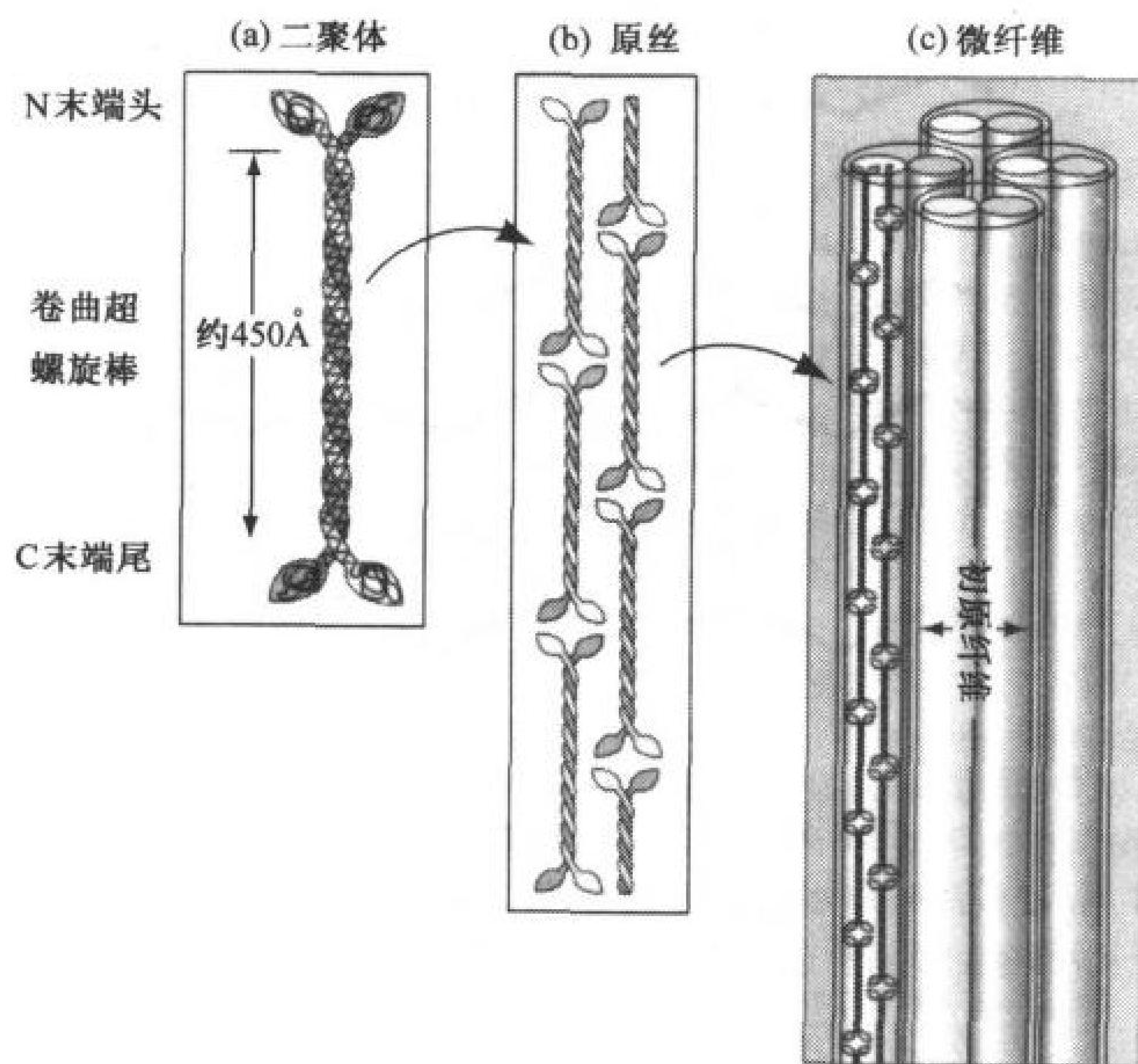


图 6-15　α 角蛋白高级结构

(a) 两条角蛋白肽链组成卷曲螺旋二聚体。(b) 原丝由两列错开的首尾相连的卷曲螺旋构成。(c) 原丝二聚化形成初原纤维，4 根初原纤维形成微纤维，后者的结构不太确定。

134

α 角蛋白含丰富的 Cys 残基，它们通过二硫键的形成来连接相邻肽链。根据硫含量的高低，α 角蛋白分为硬、软两类。硬角蛋白如毛发、角、指甲等，与软角蛋白如皮肤、愈伤组织等相比，不太柔软，因为二硫键阻碍形变。用硫醇可将二硫键还原断裂（节 5-3A）。用该方法处理过的头发可以卷曲，再用氧化剂重建卷曲构象的二硫键，则可使卷曲的头发定型，保持长久波形，这就是"烫发"的原理。反过来，卷发也可经同样的过程拉直。

由于卷曲螺旋具有拉直时缠绕放松、外力消除时又恢复原状的倾向，所以毛发和羊毛纤维都具有弹性。如果断裂其中的一些二硫键，那么 α 角蛋白可拉伸到原长的两倍以上，这时的肽链转变为 β 折叠构象。β 角蛋白，如羽毛中的角蛋白，在天然状态表现为一种类 β 折叠的模式。

丝心纤维——β 折叠

昆虫和节肢动物（蜘蛛）吐丝来制造茧、网、巢和卵柄这类结构。**丝心纤维**（silk fibroin）是来自养殖的家蚕 *Bombyx mori* 蛾幼虫的纤维蛋白，由反平行 β 折叠组成，其伸展的肽链平行于纤

维轴。序列研究发现，丝心纤维含有 6 残基重复序列：



(-Gly-Ser-Gly-Ala-Gly-Ala-)$_n$

由于 β 股中连续残基的侧链是伸向 β 折叠两面相反的方向(图 6-10)，所以丝心纤维中 Gly 侧链均从 β 折叠片一侧的表面伸出去，而 Ser、Ala 侧链则从 β 折叠片的另一表面伸出去，这样 β 折叠片堆积时，Gly 侧链接触层与 Ser、Ala 侧链接触层交替出现，形成一微晶阵列(图 6-16)。

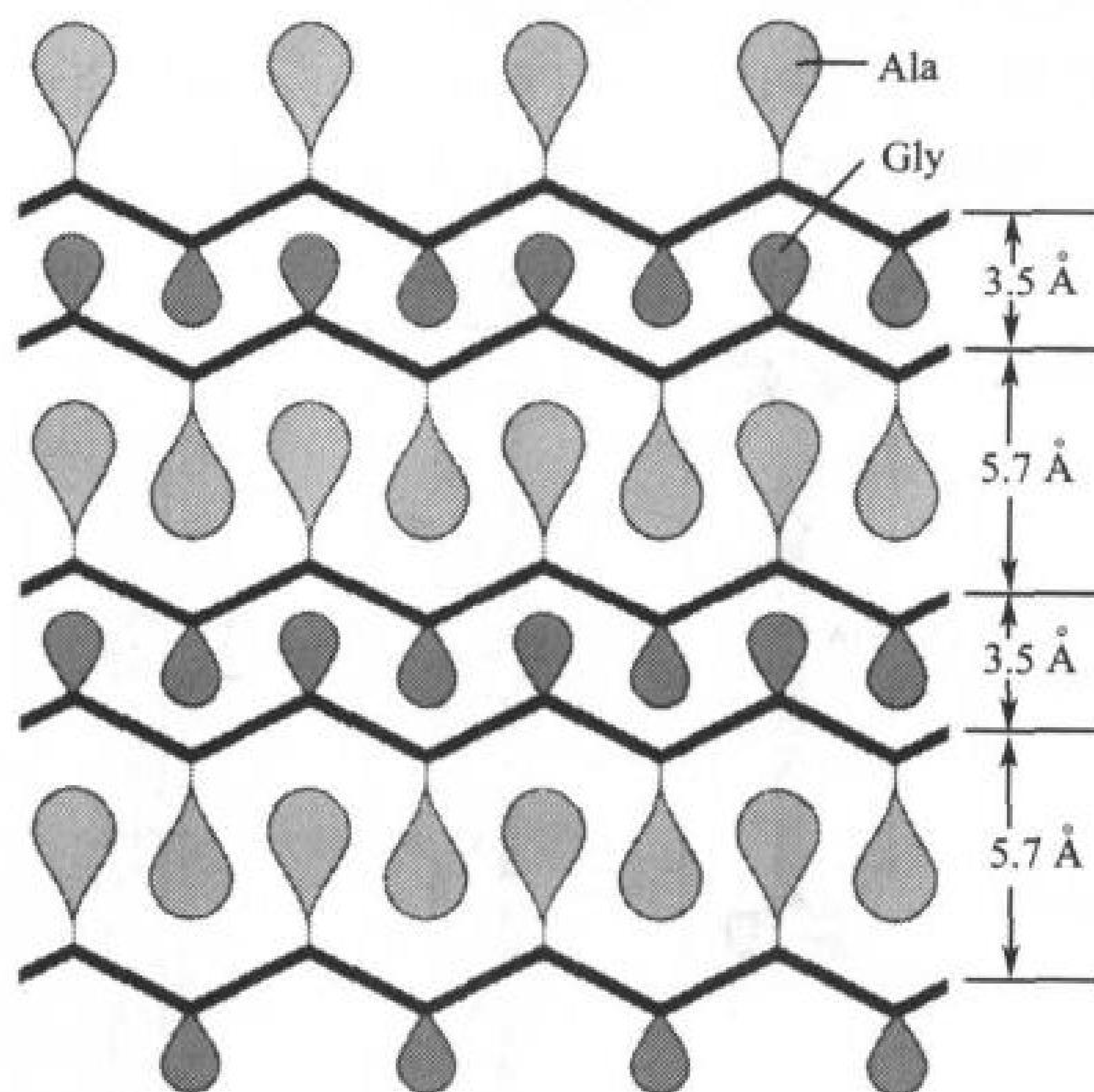


图 6-16 丝心纤维 β 折叠片结构侧视图

交替出现的 Gly 和 Ala(或 Ser)残基伸向 β 股的相反两侧。这样，一个片层上的 Gly 侧链(紫色)与相邻片层的 Gly 侧链密切嵌合，Ser 和 Ala 侧链(棕色)亦以同样的方式嵌合。其结果是层间距以 3.5Å 和 5.7Å 交替出现。

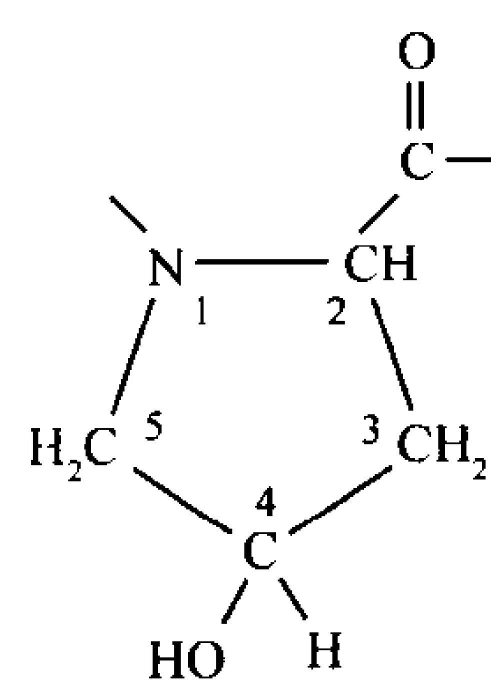
(引自 Irving Geis)

β 折叠结构可说明丝的机械性质。作为强度最大的纤维之一，丝只有很小的伸缩性，因为本来肽链已近乎完全伸展，若再拉伸则必须断裂共价键。但这种情况并不妨碍丝的柔软性，因为相邻 β 片层之间仅靠较弱的范德华力相结合。

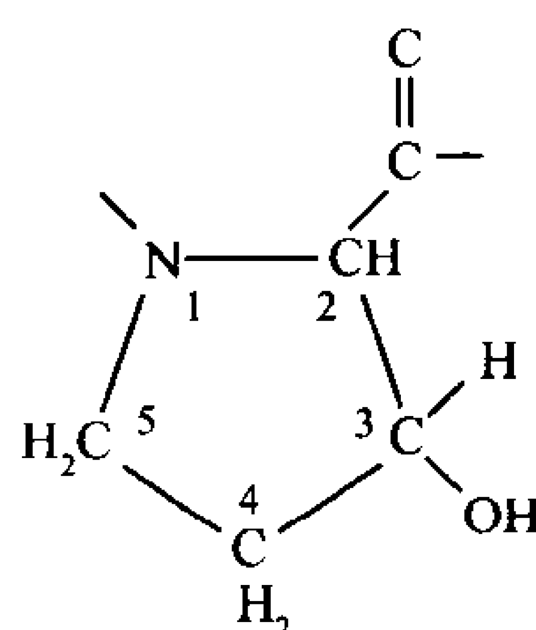
胶原——三聚螺旋

胶原(collagen)出现在所有多细胞动物中，是最丰富的脊椎动物蛋白。其纤维结实、不可溶，是结缔组织如骨、齿、软骨、腱以及皮肤和血管纤维等基质的主要受力成分。单个胶原分子由三条多肽链构成，哺乳动物有约 30 种不同的肽链装配成的至少 19 种胶原衍生物，存在于同一个体的不同组织中。一种最常见的胶原称为 I 型胶原，含两条 α_1(I)链和一条 α_2(I)链，分子质量约 285kDa，长约 3000Å，宽约 14Å。

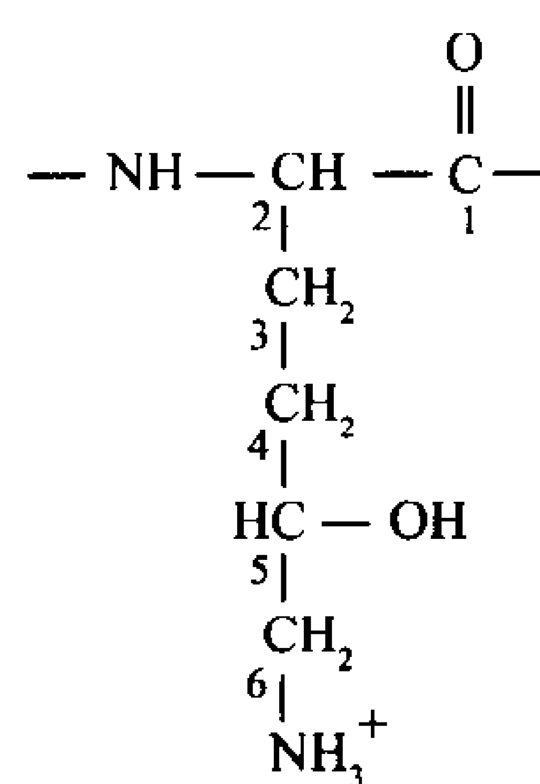
胶原拥有独特的氨基酸组成：近三分之一的残基是 Gly，另有 15%至 30%为 Pro 和 **4-羟脯氨酰**(4-hydroxyprolyl, Hyp)，**3-羟脯氨酰基**(3-hydroxyprolyl)与 **5-羟脯氨酰**(5-hydroxylysyl, Hyl)基也存在于胶原中，但含量较小。



4-羟脯氨酰基
(Hyp)

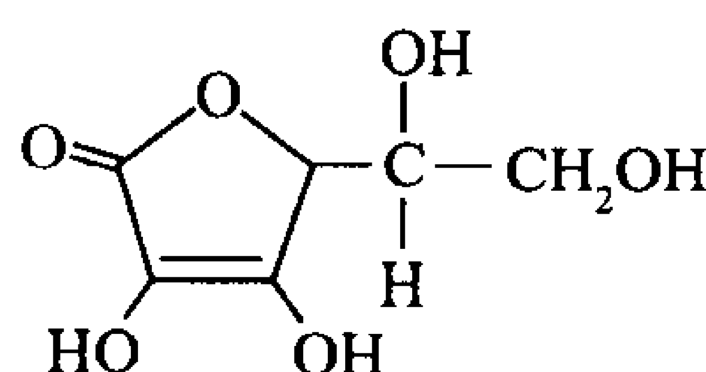


3-羟脯氨酰基



5-羟脯氨酰基
(Hyl)

这些非标准残基是在胶原合成之后形成的,例如,Pro 残基在由**脯氨酰羟化酶**(prolyl hydroxylase)催化的反应中转变为 Hyp,该酶需要**抗坏血酸**(维生素 C)(ascorbic acid, vitamin C)维持活性。 135



抗坏血酸(维生素 C)

坏血病(scurvy)就是因食物缺乏维生素 C 而导致的(见框 6-1)。

框 6-1　健康与疾病的生物化学

胶原病

一些胶原病与饮食有关。坏血病(由维生素 C 缺乏引起)中,Hyp 的生成减少,因为脯氨酰羟化酶需要维生素 C。如果没有维生素 C,新合成的胶原就无法正常地形成纤维,导致皮肤损伤、血管破裂、伤口愈合不良甚至死亡。坏血病在长途航行的水手中较为普遍,他们的饮食中缺乏新鲜食品。著名探险家 Capt. James Cook 将酸橙引入英国海军食谱,减少了坏血病发病率,因而人们又戏称英国水手为"酸橙"。

山黧豆中毒症(lathyrism)由长期摄入山黧属(*Lathyrus odoratus*)甜豆种子引起,其中含一种特异性赖氨酰氧化酶的失活剂,引起胶原纤维交联减少,产生骨、关节和大血管的严重异常。

已知好几种罕见的胶原遗传病。在多数人组织中构成主要结构蛋白的 I 类胶原的突变会引起成骨不全(osteogenesis imperfecta)(脆骨病),这种疾病的严重程度随突变的位置和性质而不同,即使单个氨基酸的变化也能导致致命的后果。例如,图 6-18b 中模式多肽链的中央 Gly→Ala 置换,使得内部已经很挤的胶原螺旋局部变形,导致肽链骨架中每个 Ala(正常为 Gly)的 N—H 与邻近肽链的 Pro 羰基的氢键断裂,从而降低了胶原结构的稳定性。

突变可影响胶原分子的结构或其形成纤维的方式,在胶原病中占主导地位,因为,即使在胶原中同时也包含着正常的肽链,突变也会影响三聚螺旋的折叠或者影响纤维形成。

许多胶原病的特征是不能合成一定量的某种特定类型的胶原,或者胶原相关酶,如赖氨酰羟化酶和赖氨酰氧化酶的活性异常。Ehlers-Danlos 综合征是一组至少包含 10 种不同胶原缺乏症的疾病,这类疾病的共同特征是关节和皮肤的过度伸展性,闻名马戏中的"印度橡皮人"就是 Ehlers-Danlos 综合征。

136

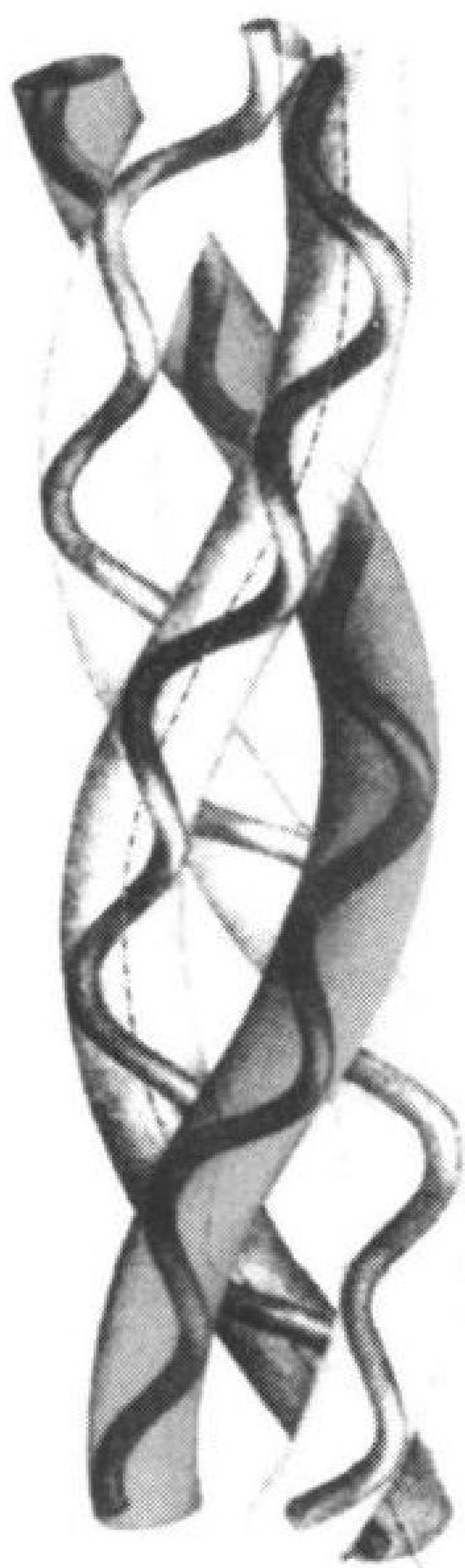


图 6-17 胶原的三螺旋结构
左手多肽螺旋缠绕在一起形成右手超螺旋结构。(引自 Irving Geis)

137

典型的胶原多肽氨基酸序列由单调重复的三残基 Gly-X-Y 序列组成，分布在长约 1000 残基的片段上，其中 X 常为 Pro，Y 常为 Hyp，Hyl 有时出现在 Y 位置上。由于重复出现 Pro，胶原不可能形成 α 螺旋[Pro 残基无法取 α 螺旋骨架构象，且缺少形成螺旋内部氢键(图 6-7)的主链 N—H 基团]。而是形成每圈约 3 个残基的左手螺旋构象。3 条平行肽链相互以右手绳样卷曲缠绕，形成胶原分子的三螺旋结构(图 6-17)。

肽链每三个残基穿过三聚螺旋中心一次，中心空间拥挤，只有 Gly 侧链才能进入，拥挤解释了胶原肽链的每第三个残基的位置上总是 Gly。三条肽链错开，这样，分别来自各肽链上的 Gly、X 和 Y 残基沿螺旋轴出现在每一个平面上，肽平面的取向使得每个 Gly 的 N—H 与相邻肽链 X 残基羰基氧原子形成强氢键(图 6-18a)。体积较大、又缺乏柔性的 Pro 和 Hyp 残基则保证了整体装配的刚性。

Barbara Brodsky 和 Helen Berman 通过测定类胶原多肽 $(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_4$-(Pro-Hyp-Ala)-$(Pro\text{-}Hyp\text{-}Gly)_5$ 的 X 射线晶体结构证实了上述胶原结构模型。该多肽的三条链相互结合，形成与模型非常相似的三螺旋结构(图 6-18b)。X 射线结构进一步发现，这种长 87Å 的筒状分子表面包围着一层有序水分子，显然起稳定胶原结构的作用。这些水分子形成氢键网络，通过与 Hyp 的 4-OH 形成氢键固定在多肽上。

胶原的致密刚性三螺旋结构保证了其特征性的张力强度。由于组成缠绕螺旋的肽链是反向缠绕的(图 6-17)，因此即使拉紧时依然能保持缠绕。高质量绳、缆和其他蛋白质如角蛋白中的纤维束，其连续缠绕也都同样为反向缠绕。

有些胶原分子装配成松散的网络或粗纤维，根据不同组织排成束或层。纤维中的胶原分子排成错开的阵列，三螺旋单元致密堆积形成的疏水相互作用稳定这种阵列。胶原也是共价交联的，所以可溶性差。胶原的交联不像角蛋白那样靠二硫键，因为胶原中几乎没有 Cys，而是由 Lys 和 His 侧链在如图 6-19 所示的反应中形成。**赖氨酰氧化酶**可将 Lys 转变为 **ε-醛基赖氨酸**(allysine)，这个酶是交联过程惟一涉及的酶。相互共价交联的侧链数目可达 4 个，共价交联多发生在胶原分子的 N 端和 C 端而不是随机的，特定组织中交联程度随生物体的年龄而增加，这就是为什么老动物的肉比幼小动物肉粗的原因。

D. 蛋白质的非重复结构

大多数蛋白是球蛋白。与上述纤维蛋白不同，球蛋白包含多种类型的规则性二级结构，如 α 螺旋、β 折叠和其他已知元件。不规则性结构或独特结构也是蛋白结构的重要部分。

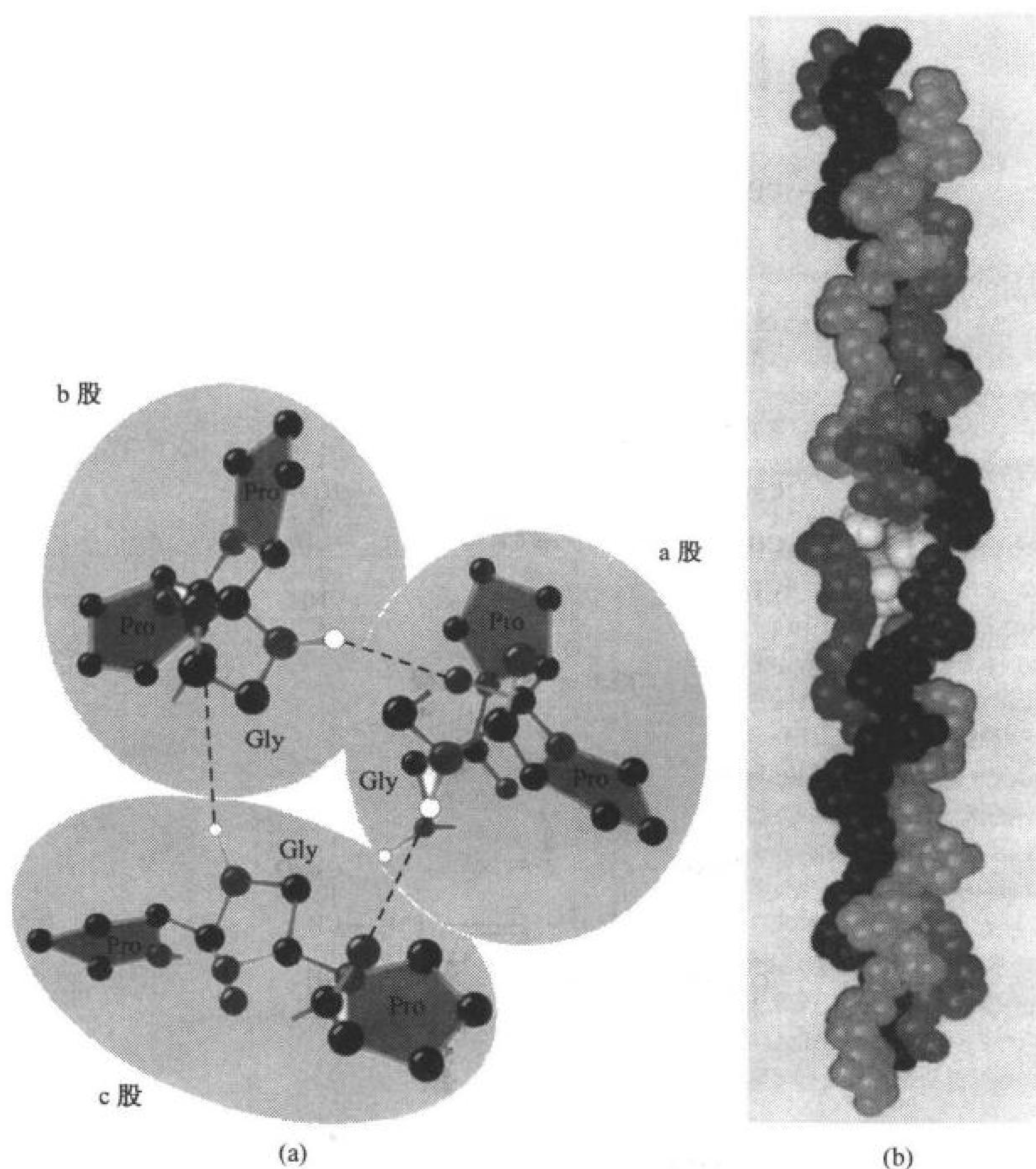


图 6-18　胶原中的分子相互作用

(a)胶原三螺旋中的氢键作用:顺着螺旋轴方向显示各条肽链上的一个 Gly 和两个 Pro(X 和 Y)。残基错开排列使 Gly、X 和 Y 三个残基沿轴出现在每一平面。虚线代表 Gly 的 N—H 基与邻链 Pro 的氧原子间形成的氢键。每条肽链上每第三个残基必定是 Gly,因为没有任何其他残基可适合接近螺旋轴的位置。Pro 庞大的侧链在螺旋外围,那里没有立体位阻。[引自 Yonath, A and Traub, W., J. Mol. Biol. 43, 461(1969)]。(b)类胶原肽的空间填充模型。3条平行肽链(蓝、紫、绿色)错开一个残基。用 Ala 残基(黄色)替换正常出现在各肽链上的 Gly 残基,导致正常胶原结构的严重变形。(引自 Helen Berman, Rutgers University)

不规则性结构

不具有相似 Φ、Ψ 值的连续残基构成的多肽片段有时称为卷曲,注意不能将它与**无规卷曲**(random coil)混淆,无规卷曲指的是溶液中的**变性**(denatured)蛋白质(折叠完全展开),完全无序且快速变动的构象。在**天然**(native)(折叠)蛋白质中,非重复结构有序度并不亚于螺旋或 β 折叠,它们只是不太规则,因而更不容易描述罢了。

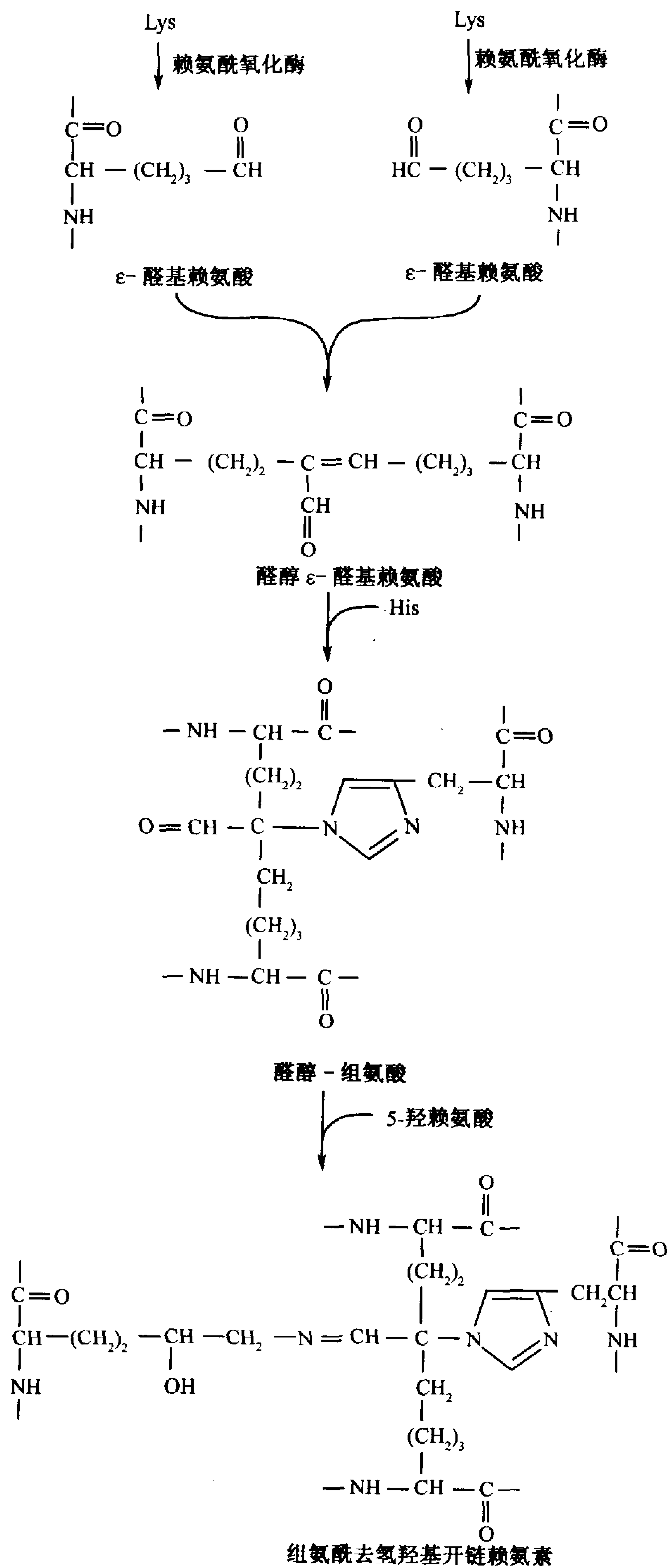


图 6-19 胶原蛋白侧链交联的反应途径

第一步是赖氨酰氧化酶催化的赖氨酸氧化脱氨作用，形成 ε-醛基赖氨酸，然后两个醛基赖氨酸进行醛醇缩合产生醛基赖氨酸缩合物，该产物可与 His 反应产生醛缩组氨酸，它反过来又与 5-羟赖氨酸反应产生希夫碱（一种亚胺键），从而交联 4 个侧链。

标准二级结构的衍化

氨基酸序列的变化和折叠蛋白质整体结构的变化均会引起二级结构单元通常构象的变形。例如 α 螺旋常常在起始圈和末圈偏离理想构象；同样，β 折叠片中的肽链中可能含一个“多余”的残基，它不与相邻股发生氢键作用，因而产生形变，我们称之为 **β 凸**(β budge)。 138

对于氨基酸组成和序列的许多限制(节 5-1)可能部分来自于蛋白质三维结构的构象约束。例如，Pro 会在 α 螺旋或 β 折叠中产生一个纽结，同样，几个连续的大分支侧链残基(如 Ile, Tyr)之间的立体冲突会使 α 螺旋变得不稳定。 139

Perter Chou 和 Gerald Fasman 通过对已知蛋白质结构的分析提出了残基出现在 α 螺旋或 β 折叠中的倾向性因子 P(表 6-1)。他们还发现某些残基不仅对某一特定二级结构具有很高的倾向性，而且它们还容易破坏其他二级结构。这类数据对预测已知序列的蛋白质二级结构非常有用(见框 6-2)。

框 6-2　生物化学相关内容

蛋白质结构预测和蛋白质设计

通过直接的蛋白质测序(节 5-3)或更常用的核酸测序(节 3-4)，人们已获得几十万条蛋白质序列，然而其中仅约 7000 个蛋白质测定了 X 射线晶体结构或 NMR 结构，决定一个新蛋白质的功能常常需要了解其三维结构知识。

目前有几种主要的蛋白质结构预测方法。最简单可靠的方法是同源模建(homology modeling)法。将待研究的序列与已知结构的同源蛋白质序列对齐——补偿氨基酸替换、插入和缺失——通过模建和能量优化计算。这种方法对同源性低至 25% 的蛋白质也能预测可靠的结构模型。当然，序列相似性越高，预测的模型也越准确。

远缘蛋白质即使序列很分散，没有明显的相似性，也可能有结构相似性。试配(threading)是一种计算方法，它通过确认未知结构的蛋白质是否与已知结构的蛋白一致来决定蛋白质结构。这种方法是将未知结构蛋白质的残基放在(试配)已知结构的骨架上，然后测定未知蛋白质的氨基酸侧链在这种试配下是否稳定。这种算法也有令人鼓舞的结果，但还不太可靠。

Chou 和 Fasman(表 6-1)建立的基于实验测定的统计信息的经验方法在预测蛋白质二级结构中形成 α 螺旋和 β 折叠的倾向性已较为成功，这种方法的好处是简单(不需要计算机就能工作)。

鉴于蛋白质天然结构仅决定于氨基酸序列，因此，原则上应有可能仅根据其化学和物理性质(如疏水性、大小尺寸、氢键倾向和各残基的电荷)就能预测其结构。这种从头算法还仍处于开始阶段，在预测单个 α 螺旋这样的简单结构时有一定程度的成功。但在检验已经实验测定的大肽链结构时却发生了严重错误。最近发展的一种模拟蛋白质层次折叠途径算法，预测的结构模型与相应蛋白质结构有着惊人的相似。

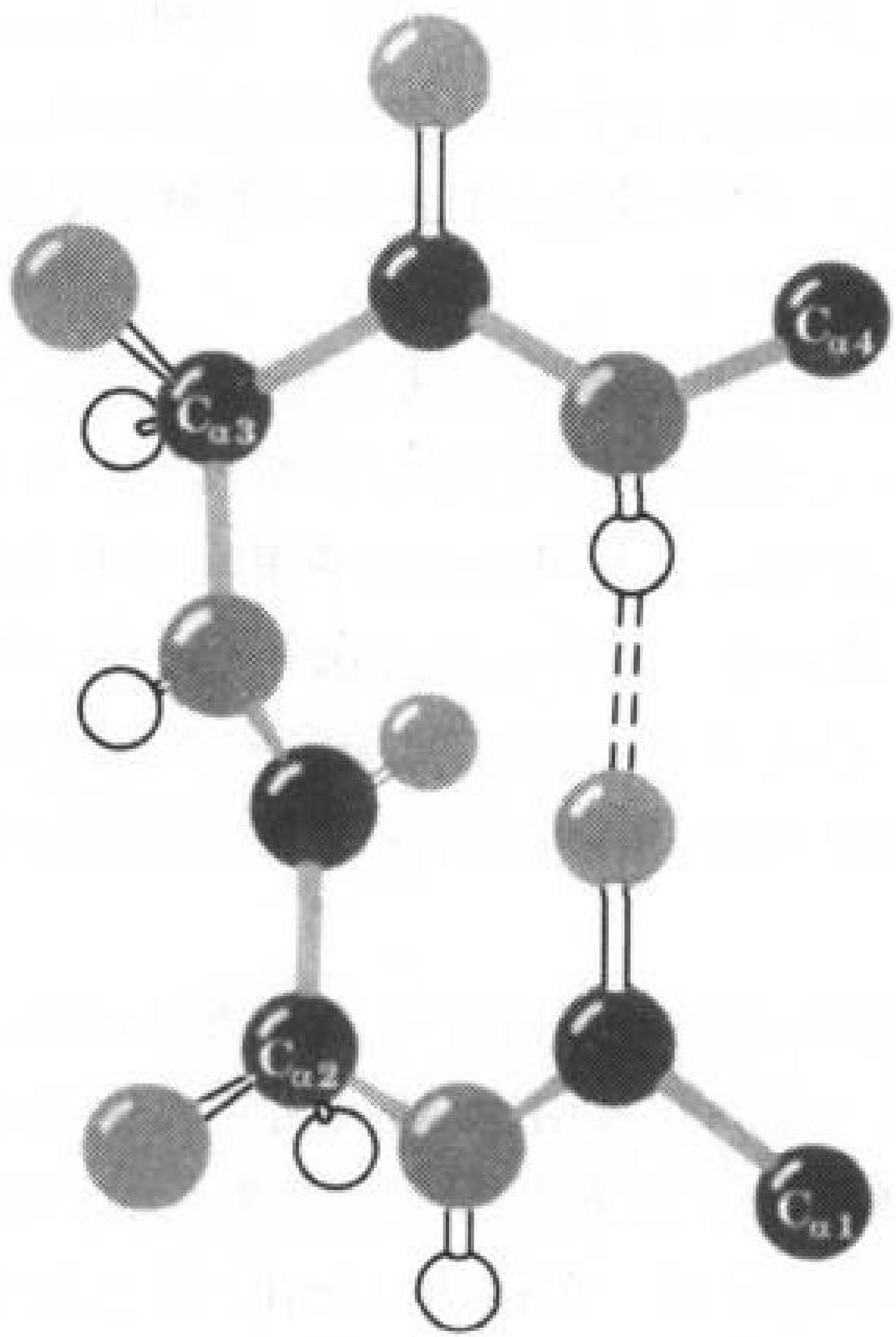
蛋白质设计是与结构预测相反的实验过程，可提供有关蛋白质折叠与稳定性的知识。蛋白质设计从一个目标结构开始，例如一个简单的 β 折叠夹层，或一束四螺旋结构，通过化学或生物合成构建一个可能形成该结构的氨基酸序列，再测定其结构。幸运的是，蛋白质折叠看上去更受总的氨基酸序列控制而不是受单个残基控制，这就允许多肽设计中存在一些错误。实验结果指出，蛋白质设计最大的挑战并不在于使多肽折叠成所希望的构象，而在于防止该多肽折叠成其他不希望的构象。在这方面，科学远落后于自然。然而，最近基于计算技术进行了一次成功的设计，一条 28 残基的多肽稳定地折叠成所希望的目标结构(这是目前已知的能够在不需要二硫键、金属离子或其他亚基帮助的情况下折叠成惟一结构的最小肽链)。这一结果表明，我们在理解蛋白质折叠问题上已取得重大的进展。

表 6-1 氨基酸残基对形成 α 螺旋和 β 折叠构象的倾向性

残基	P_α	P_β
Ala	1.42	0.83
Arg	0.98	0.93
Asn	0.67	0.89
Asp	1.01	0.54
Cys	0.70	1.19
Gln	1.11	1.10
Glu	1.51	0.37
Gly	0.57	0.75
His	1.00	0.87
Ile	1.08	1.60
Leu	1.21	1.30
Lys	1.16	0.74
Met	1.45	1.05
Phe	1.13	1.38
Pro	0.57	0.55
Ser	0.77	0.75
Thr	0.83	1.19
Trp	1.08	1.37
Tyr	0.69	1.47
Val	1.06	1.70

引自:Chou. P.Y. 和 Fasman, G.D. Annu. Rev. Biochem. 47, 258(1978)。

(a) I 类



(b) II 类

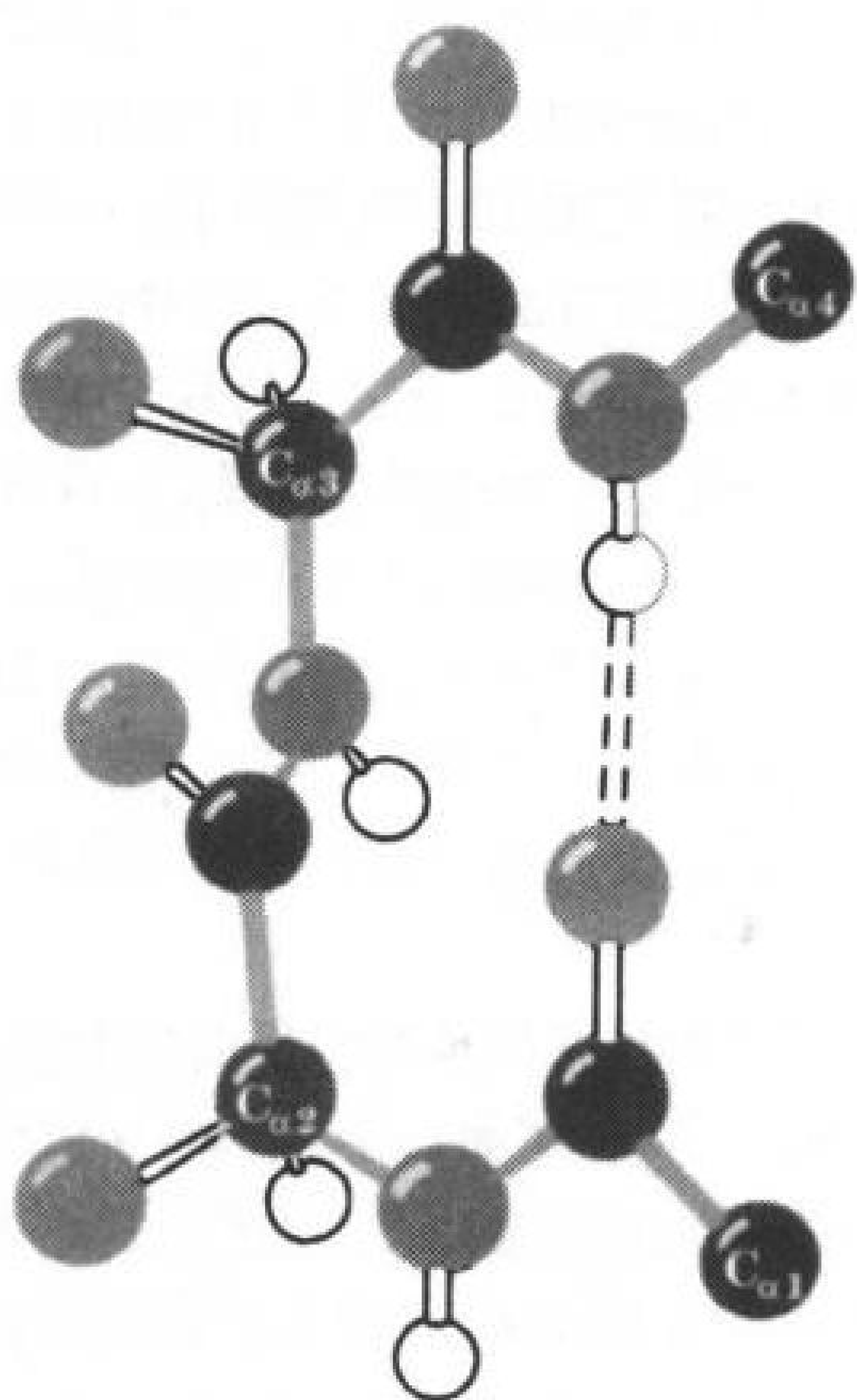


图 6-20 多肽链中的转角

虚线代表氢键。(a)I 类。(b)II 类。(引自 Irving Geirs)

α 螺旋或 β 折叠附近出现的某些残基也可能不是随机的，例如 α 螺旋的邻侧常为 Asn 和 Gln 这类残基，它们的侧链能够折回，与螺旋的 4 个末端残基之一形成氢键，该现象被称为**螺旋帽**(helix capping)。回想一下，α 螺旋两端的 4 个残基与相邻骨架片段之间没有充分地氢键键合(图 6-7)。

转角与环

规则性二级结构 α 螺旋或 β 折叠股片段一般由陡然改变方向的一段肽相连接，这种**转角**(reverse turn)或 **β 弯折**(β bend)(因常常连接连续的反平行 β 折叠股而得名)几乎总是出现在蛋白质表面。多数转角涉及 4 个氨基酸残基，它们的排列大致有两种可能的方式，I 类或 II 类，不同之处在于连接第 2 位残基与第 3 位残基的肽平面翻转了 180°(图 6-20)。这两类转角均由一个氢键来稳定，尽管偏离理想构象常会破坏这个氢键。在 II 类转角中，2 位残基上的氧原子与 3 位残基的 C_β 原子争夺空间，所以 3 位残基通常为 Gly。不管哪类转角，第 2 位常常都是 Pro，因为它能够确保所需要的构象。

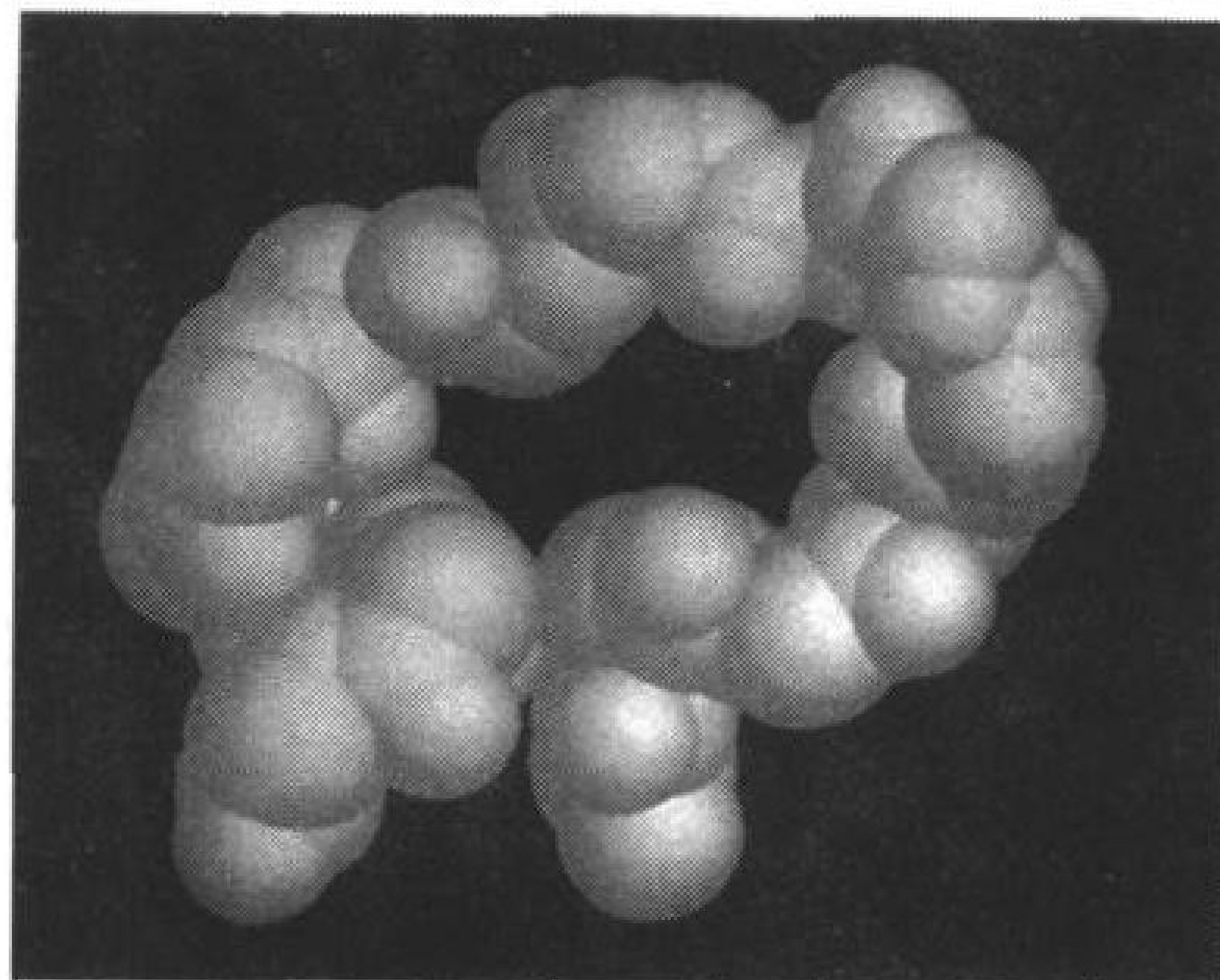


图 6-21　一个 Ω 环的空间填充模型

仅显示了骨架原子。侧链填入环中。该结构来自细胞色素 *c* 的 40～54 号残基。(引自 George Rose, The Johns Hopkins University)

几乎所有 60 个残基以上的蛋白质都含有一个或几个由 6 至 16 个残基组成的环，称为 **Ω 环**(Ω loop)。这些像希腊大写字母 Ω(图 6-21)的颈状环是致密的球状体，因为其侧链趋向于填入其内部空穴。由于 Ω 环几乎总是位于蛋白表面，它们在生物识别过程中可能起重要作用。　140

2. 三级结构

蛋白质的三级结构描述其二级结构元件的折叠并且指明蛋白质中各原子的位置，包括侧链原子。已知的蛋白质结构是由 **X 射线晶体学**(X-ray crytallographic)或**核磁共振**(NMR)研究获得的。大多数结构的原子坐标存放在蛋白质结构数据库(PDB)中，这些数据不难通过互联网(http://www.rcsb.org)得到，还允许分析比较不同蛋白质的三级结构。蛋白质三级结构的共同特性揭示了许多有关蛋白质生物功能和进化起源的奥秘。

A. 蛋白质结构测定

X 射线晶体学是研究大分子结构的一个最有力的手段。根据光学原理，物体位置的不确定程度约等于所用辐射波的波长。X 射线可直接使分子成像，因为 X 射线波长与共价键键长相当(约 1.5Å，用光学显微镜是看不见单个分子的，因为可见光的最短波长是 4000Å)。

当分子晶体置于一束平行校准的 X 射线中时，分子中的原子散射 X 射线，散射线相消或相长称为衍射。产生的**衍射图谱**(diffraction pattern)用光学胶片记录(图 6-22)或由辐射记数器记录，然后，用衍射最大强度(胶片上衍射斑点的深度)通过数学方法建立晶体结构的三维图像。图 6-22 中的照片仅为肌红蛋白晶体衍射全部信息中的一小部分。相反，纤维蛋白不能结晶，只能　141

拉成纤维,其 X 射线衍射谱仅有很少的衍射点,因而只含较少的结构信息。同样,DNA 纤维(图 3-8)的衍射谱也较为简单。

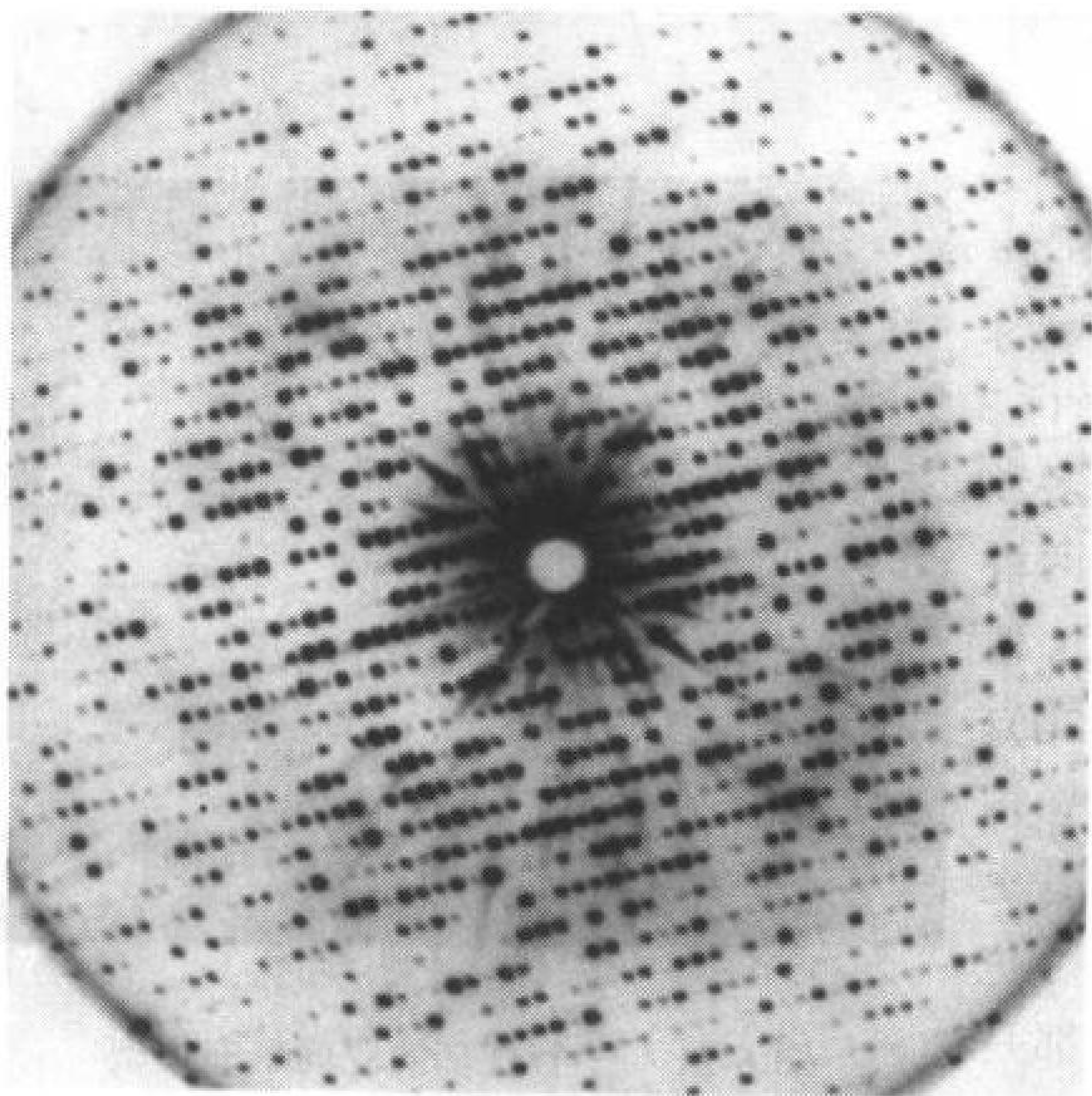


图 6-22　抹香鲸肌红蛋白晶体 X 射线照片
各衍射最大强度(点的深度)是晶体电子密度的函数。
(引自 John Kendrew, Cambridge University, U.K)

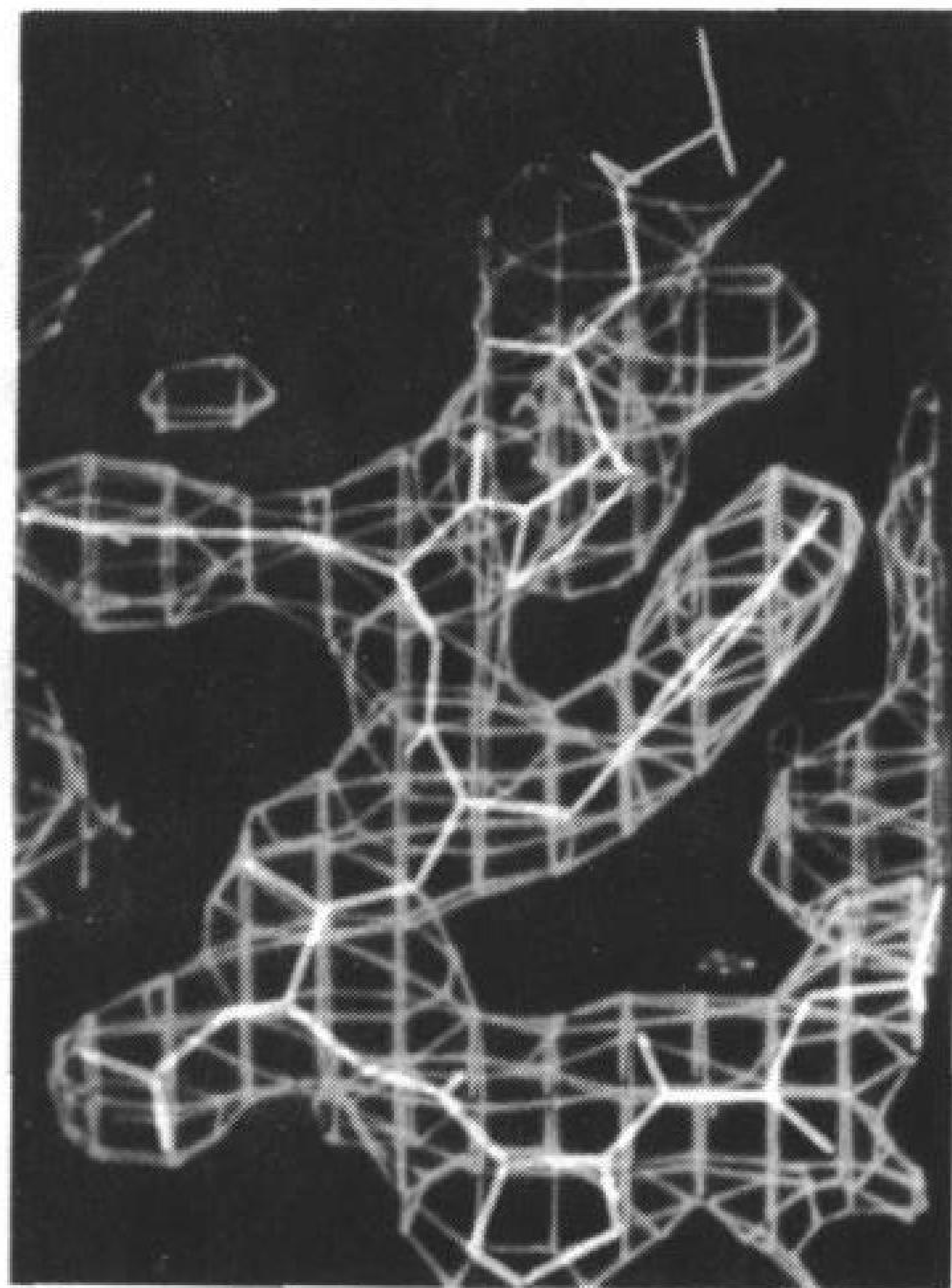


图 6-23　一幅电子密度图
电子密度(橙色)的三维轮廓与重叠在上面的对应多肽片段的原子模型(白色)。该结构是人鼻病毒(引发流感的病毒)的一部分。(引自 Michael Rossman, Purdue University)

X 射线几乎仅仅作用于物质的电子而不与核作用,所以,X 射线结构就是被研究对象的电子密度图像,可用三维**等高线图**(contour map)(图 6-23)表示,仅有一个电子的氢原子在大分子 X 射线结构中是看不见的。

有机小分子的 X 射线结构测定分辨率可达约 1Å,极少有蛋白质晶体具有这种有序程度,并且,不是所有蛋白质都可被巧妙地结晶,亦即以有序三维阵列方式沉淀。已形成晶体的蛋白质(图 6-24)也与多数有机小分子晶体不同,它们是高度水化的,通常含 40%~60%体积的水。大溶剂含量使蛋白质晶体呈现一种松软的胶状,所以分子常有几个 Å 的无序程度。这些因素将蛋白质结构测定的分辨率限制在 2~3.5Å 范围内,当然也有一些蛋白质晶体有序度高些(分辨率较高)。

几个 Å 的分辨率太粗糙,无法清楚地给出单个原子的位置,但肽链骨架独特的形状通常仍能跟踪,由此也能推出其侧链位置和方向。然而因许多侧链大小、形状相似,所以需要蛋白质一级结构的知识,将氨基酸序列和对应的电子密度图配合,然后用数学方法将原子位置精化到约 0.1 Å之内的高分辨率结构。

蛋白质高溶剂含量的另一结果是结晶蛋白质保持其天然构象,因而自然也得以保持其功能。蛋白质在晶体中的水化程度实际上与细胞中类似,这使人们得以从蛋白质晶体结构理解生物活

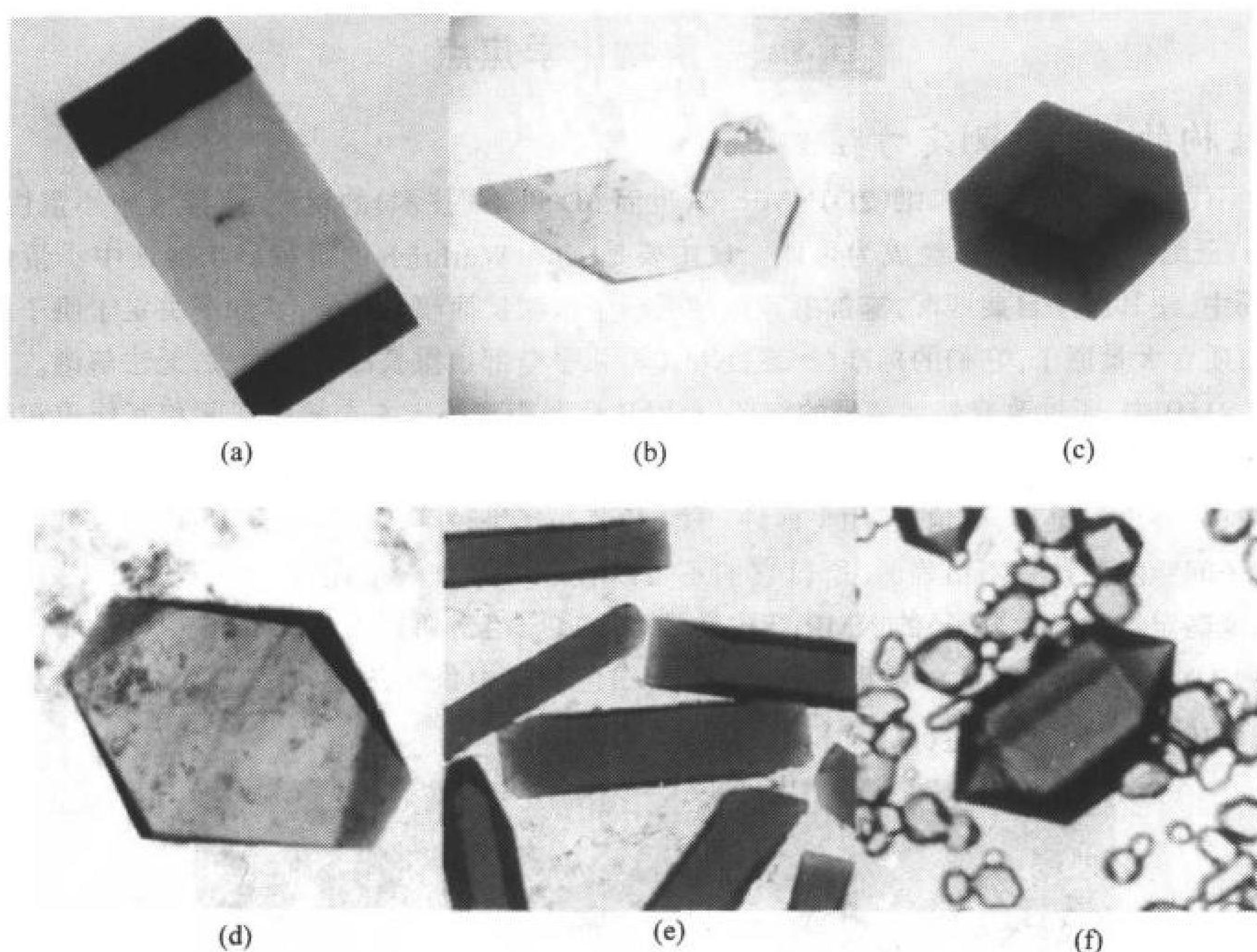


图 6-24　蛋白质晶体

(a)假单胞杆菌属铜绿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)天青蛋白。(b)脱硫弧菌属(*Desulforibrio*) *vulgaris* 黄素氧还蛋白(*Desulfovibrio vulgaris*)。(c)巴斯德芽菌(*Clostridium Pasteurianum*)红素氧还蛋白。(d)海洋螨虫管水母体(*Siphonosoma funafuti*) *azidomet* 蚯蚓肌红蛋白。(e)七鳃鳗血红蛋白。(f)突柄绿菌属(*Prosthecochloris aestuarii*)杆菌叶绿素 a 蛋白。这些晶体有颜色,因为蛋白质含吸色基团,若没有这类基团则为无色。(a-c 引自 Larry Siecker, University of Washington; d、e 引自 Wayne Hendrikson, Columbia University; f 引自 John Olsen, Brookhaven National Laboratories, and Brian Matthews. University of Oregon)

性。晶体结构已经用作药物设计的起始点,在生理条件下特异性地作用于靶蛋白。

NMR 谱学新近的进展已允许人们测定蛋白质和核酸在溶液中的结构(但仅限于<30kDa 的分子)。这样,NMR 技术可以用于阐明那些无法结晶的蛋白质和其他大分子(见框 6-3)的结构。在多个 X 射线结构和 NMR 结构都测出的例子中,两种结构几乎没有明显差别。

蛋白质的可视化

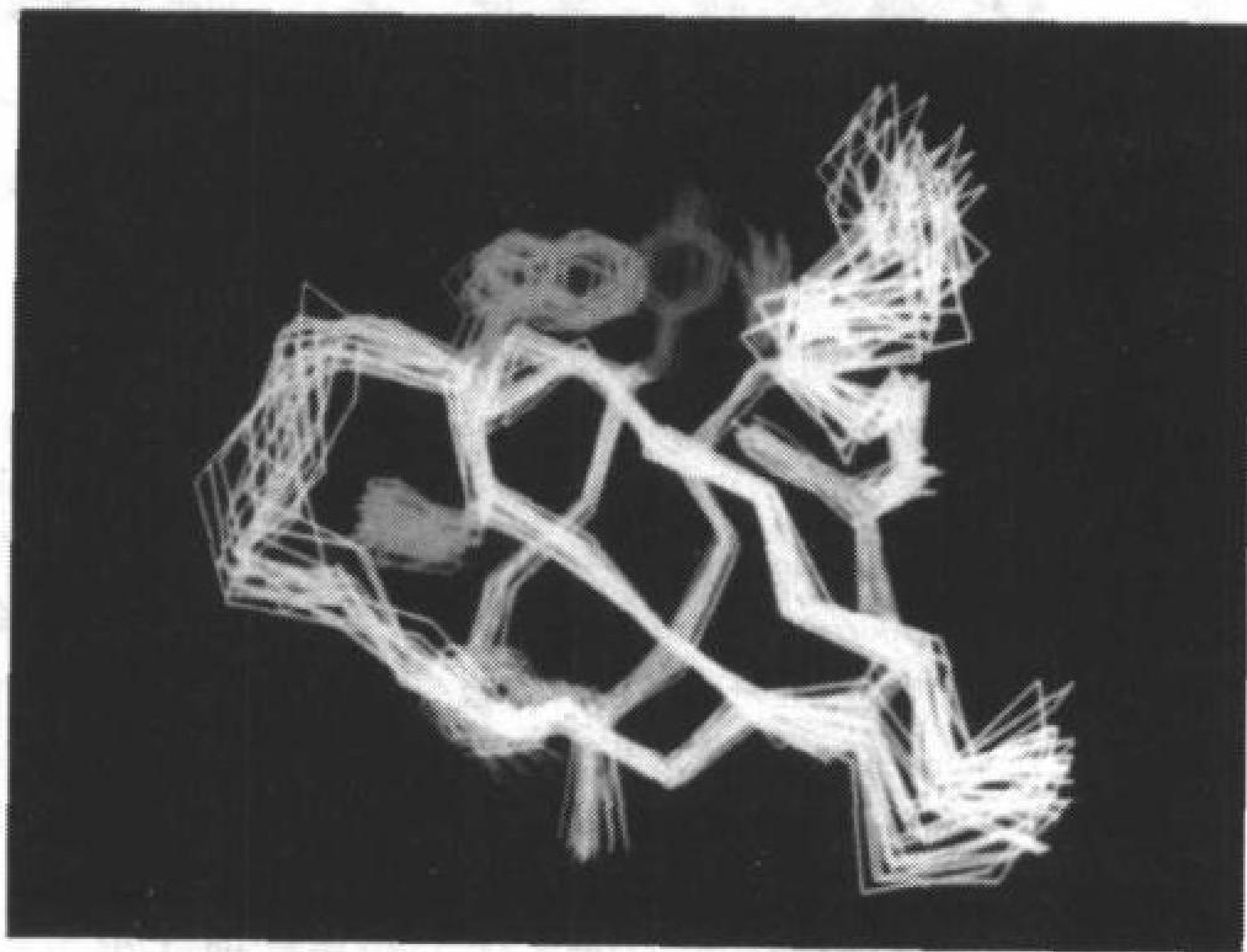
蛋白质包含大量原子,无法使用类似有机小分子的模型来显示其具体结构。球棒模型显示所有或几乎所有蛋白质原子(如图 6-7、6-10),显得过于杂乱;空间填充模型(如图 6-8、6-11)遮掩了蛋白质内部细节,所以常用计算机生成的或艺术的示意图来表示蛋白质结构。通过跟踪 C_α 位置,或将螺旋表示成条带或筒,β 折叠表示成一系列由 N 端指向 C 端的扁平箭头来展示肽链的走向。

框6-3 生物化学焦点

蛋白质结构的NMR测定方法

从80年代中期开始，由于二维(2D)NMR谱(进而3D和4D技术)的发展，水溶液中小蛋白质(<250个残基)三维结构的测定已经成为可能。这主要是Kurt Wüthrich的贡献。水溶液中小蛋白质样品置于磁场中，使其质子自旋匹配，施加射频脉冲时质子被激发而辐射信号，其频率决定于质子的分子环境。蛋白质含大量原子，它们的标准(一维)NMR谱几乎全部由重叠的信号构成，无法解谱。

在2D NMR中，通过改变外加信号的特征，可以从空间距离小于5 Å的质子间相互作用和仅由一个或两个其他原子共价连接的质子间相互作用中获取更多的信息。由此得到的一系列距离加上已知的几何约束，如共价键键长、键角、基团平面性、手性和范德华半径等，可用于计算蛋白质三维结构。然而，由于质子间距的测量是不精确的，所以它们不足以代表一个惟一的结构。由于这个原因，蛋白质(或任何其他确定结构的大分子)的NMR结构常常表示成一组密切相关结构的集合。下图中一个64残基多肽的NMR结构表示为20条重叠的C_α走向(白色)，其中每一条走向都与NMR数据及几何约束相符，图中还显示了一些侧链(红、黄和蓝色)。



(引自 Stuart Schreiber, Harvard University)

143

B. 基序(超二级结构)与结构域

自从Kendrew解出肌红蛋白结构以来，已报道了近7000个蛋白质结构，没有两个结构是绝对同样的，但这些结构却表现出值得注意的一致性。

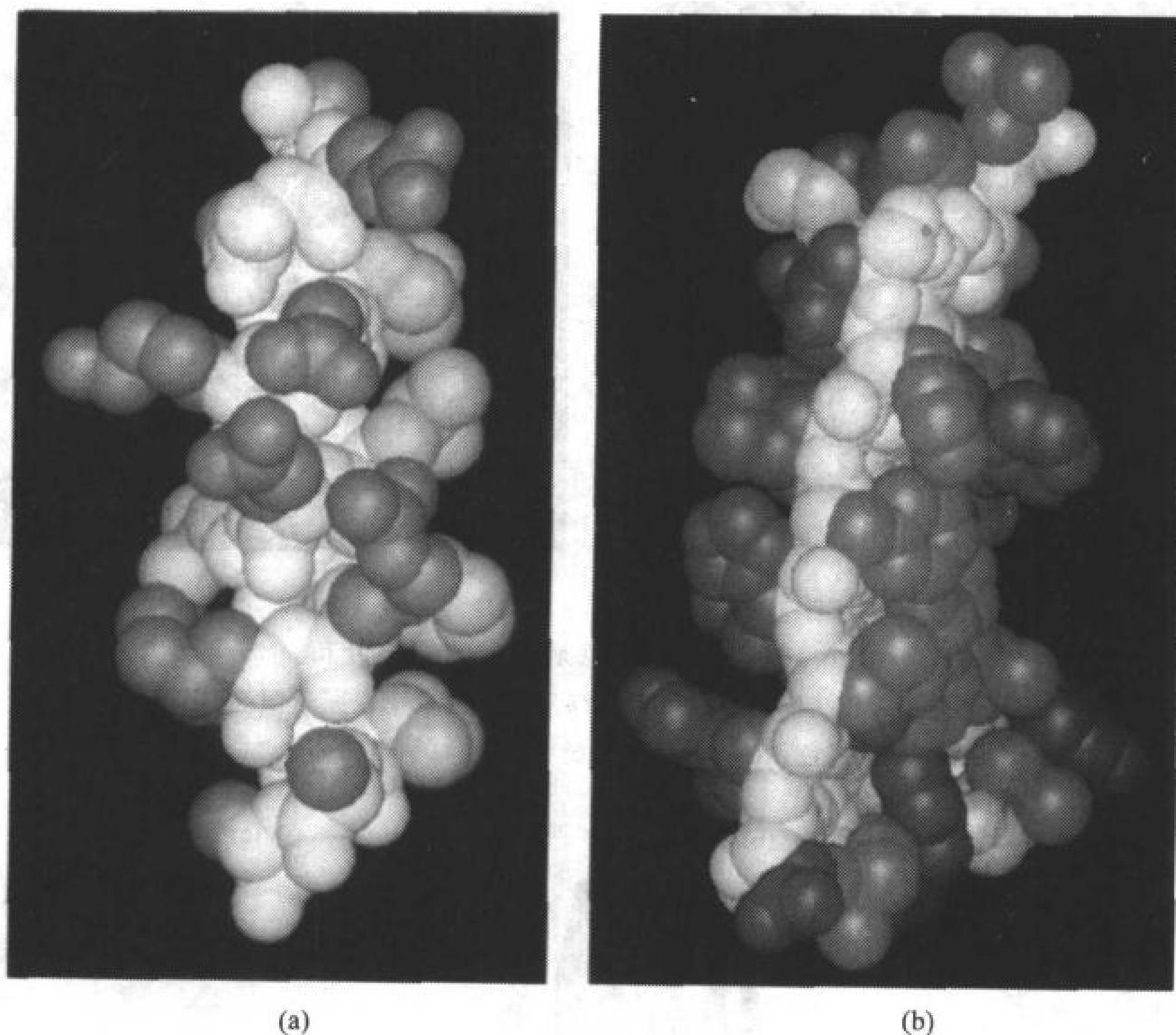
侧链位置随极性的变化

球蛋白的一级结构通常都缺少像维持纤维蛋白规则性构象的那些重复序列，但球蛋白中氨基酸侧链是根据极性进行空间分布的：

1) 非极性残基Val、Leu、Ile、Met和Phe多在蛋白质内部，避开水溶剂。驱动这种分布的疏水效应是形成天然蛋白质三维结构的重要因素。
2) 带电荷的极性残基Arg、His、Lys、Asp和Glu常位于蛋白质表面，与溶剂接触。因为将离子埋在无水的蛋白质内部在能量上是不利的。

3) 不带电荷的极性基团 Ser、Thr、Asn、Gln 和 Tyr 一般在蛋白质表面,也出现在内部。当埋在内部时,这些残基几乎总是与其他基团产生氢键,从某种意义上说,氢键的形成中和了它们的极性,对主链也是同样的情形。

这些侧链的分布原则在个别二级结构单元(图 6-25)和整个蛋白质(图 6-26)中都是很明显的,极性侧链趋于伸向蛋白质外面以帮助表面的形成,非极性侧链则大多伸向内部,即占据内部。



(a)　　(b)

图 6-25　α 螺旋和 β 折叠中的侧链位置

在这些空间填充模型中,主链为白色,黄色或棕色为非极性侧链,紫色为极性侧链。(a)抹香鲸肌红蛋白中的一个 α 螺旋,注意非极性侧链主要位于螺旋的一侧。(b)刀豆球蛋白 A 中的一个反平行 β 折叠片(侧视),右侧朝里,左侧向着蛋白质外面。

144

多数蛋白质相当致密,内部原子堆积的程度甚至高于有机小分子晶体,但蛋白质侧链原子总是永远取低能量排列方式,很明显,尽管存在大量的分子内相互作用,内部侧链总是取松弛构象。致密堆积的蛋白质内部一般是将水排除在外的,如果分子内部有水,则通常占据可形成氢键的特殊位置,有时作为蛋白质两氢键键合基团之间的桥梁。

螺旋和折叠可用各种方式组合

二级结构元件的主要类型,α 螺旋和 β 折叠,在球蛋白中出现的比例和组合方式是多种多样的。有些蛋白质如血红蛋白亚基,仅含 α 螺旋,其间只有短的连结(图 6-27a),另外一些蛋白质如**刀豆球蛋白 A**,β 折叠占极大的比例,没有 α 螺旋(图 6-27b)。多数蛋白质中两种二级结构含量都较大(平均约 31%的 α 螺旋和 28%的 β 折叠),如**丙糖磷酸异构酶**(图 6-27c)和羧肽酶 A(图 6-12)。

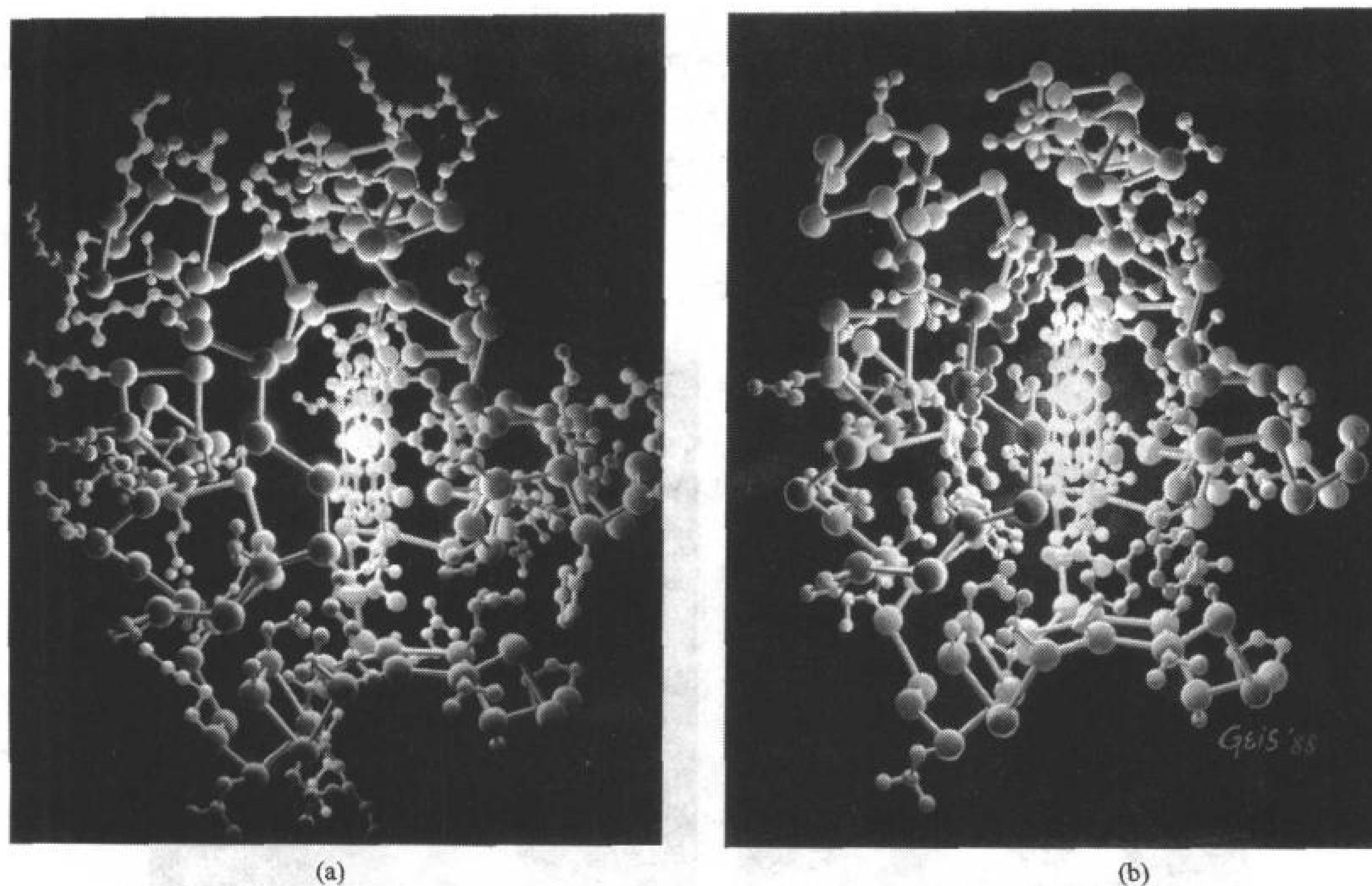


图 6-26 马心细胞色素 c 中的侧链分布

根据 Richard Dickerson 测定的 X 射线结构。蛋白质被血红素中央的单个铁原子照亮，未显示氢原子。(a)中，亲水侧链为绿色。(b)中，疏水侧链为橙色。(引自 Irving Geis)

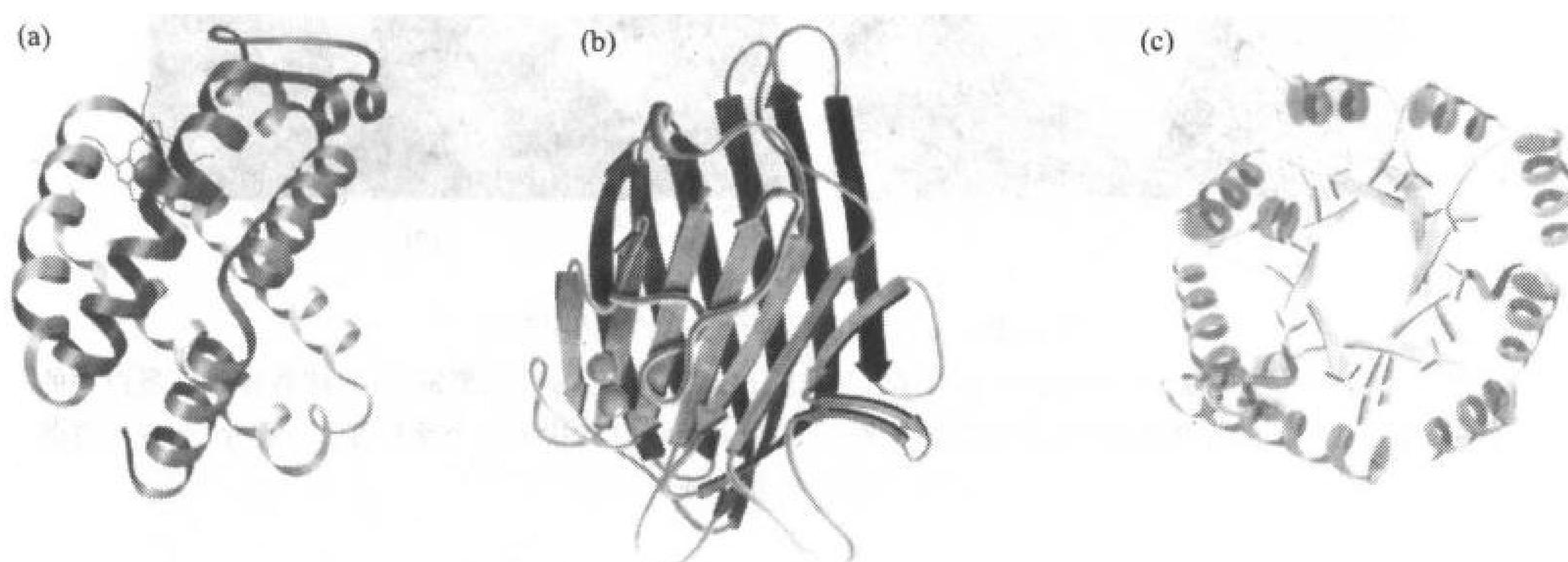


图 6-27 球蛋白举例

不同蛋白质中所含二级结构元件的比例和排列方式不同。在这些模型中，α 螺旋画成螺旋条带，β 折叠股画成指向 C 端的扁平箭头。(a)肌红蛋白亚基，血红素辅基显示为骨架模型。(b)刀豆球蛋白 A，球代表金属离子。(c)鸡肌肉丙糖磷酸异构酶。(引自 Jane Richardson, Duke University)

145 很多无关的球蛋白中存在二级结构元件的一些特定组合，称为**超二级结构**(supersecondary structure)或基序(motif)。

1)最常见的超二级结构形式是 **βαβ 基序**(βαβ motif)，在此基序中，一个 α 螺旋连接 β 折叠的两条平行股(图 6-28a)。

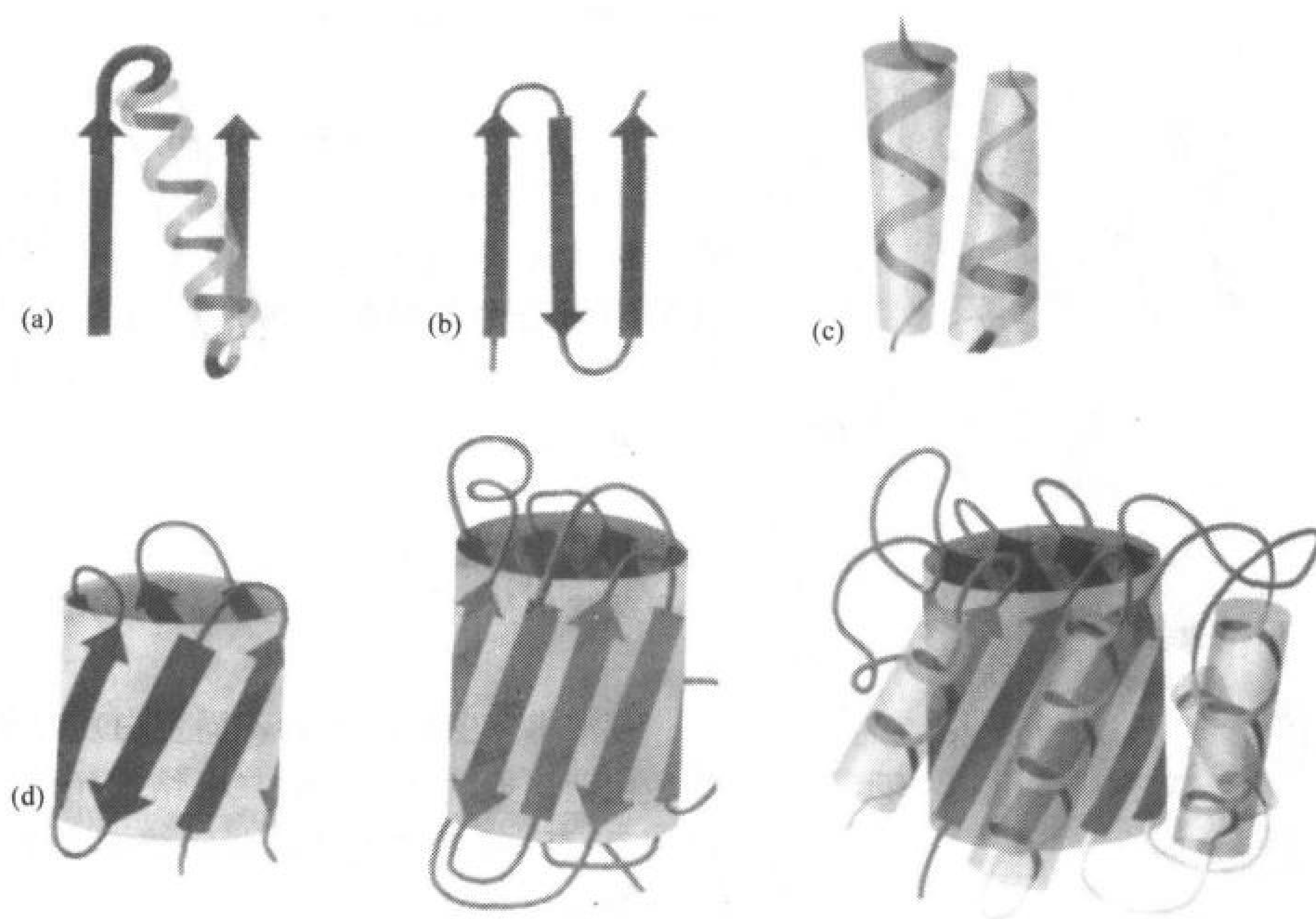


图 6-28　蛋白质基序

(a)βαβ 基序。(b)β 发夹。(c)αα 基序。(d)β 桶,由重叠的 βαβ 单元(最右边)组成的 β 桶称 α/β 桶,图 6-27c 是它的顶视图。

2)另一常见的超二级结构 **β 发夹**(β hairpin)基序由相对紧凑的转角连接反平行 β 股(图 6-28b)。

3)**αα 基序**(αα motif),两段连续的反平行 α 螺旋相互堆积,螺旋轴相对倾斜,使接触侧链的相互切合在能量上有利(图 6-28c)。这类组合稳定了 α 角蛋白的卷曲螺旋构象。

4)伸展的 β 折叠片常卷起来形成 **β 桶**(β barrel)。图 6-28d 展示了三种类型的 β 桶。

基序具有结构与功能双重意义,Michael Rossman 发现 βαβαβ 单元常用作核苷酸结合位点,该基序中 β 股由 α 螺旋相连形成平行折叠片结构。在很多结合二核苷酸(如烟酰胺腺嘌呤二核苷酸,NAD^+;节 3-1)的蛋白质中,两个 βαβαβ 基序单元又组合成一个称为**二核苷酸结合团**(dinucleotide-binding fold)或 **Rossman 折叠**的基序(图 6-29)。

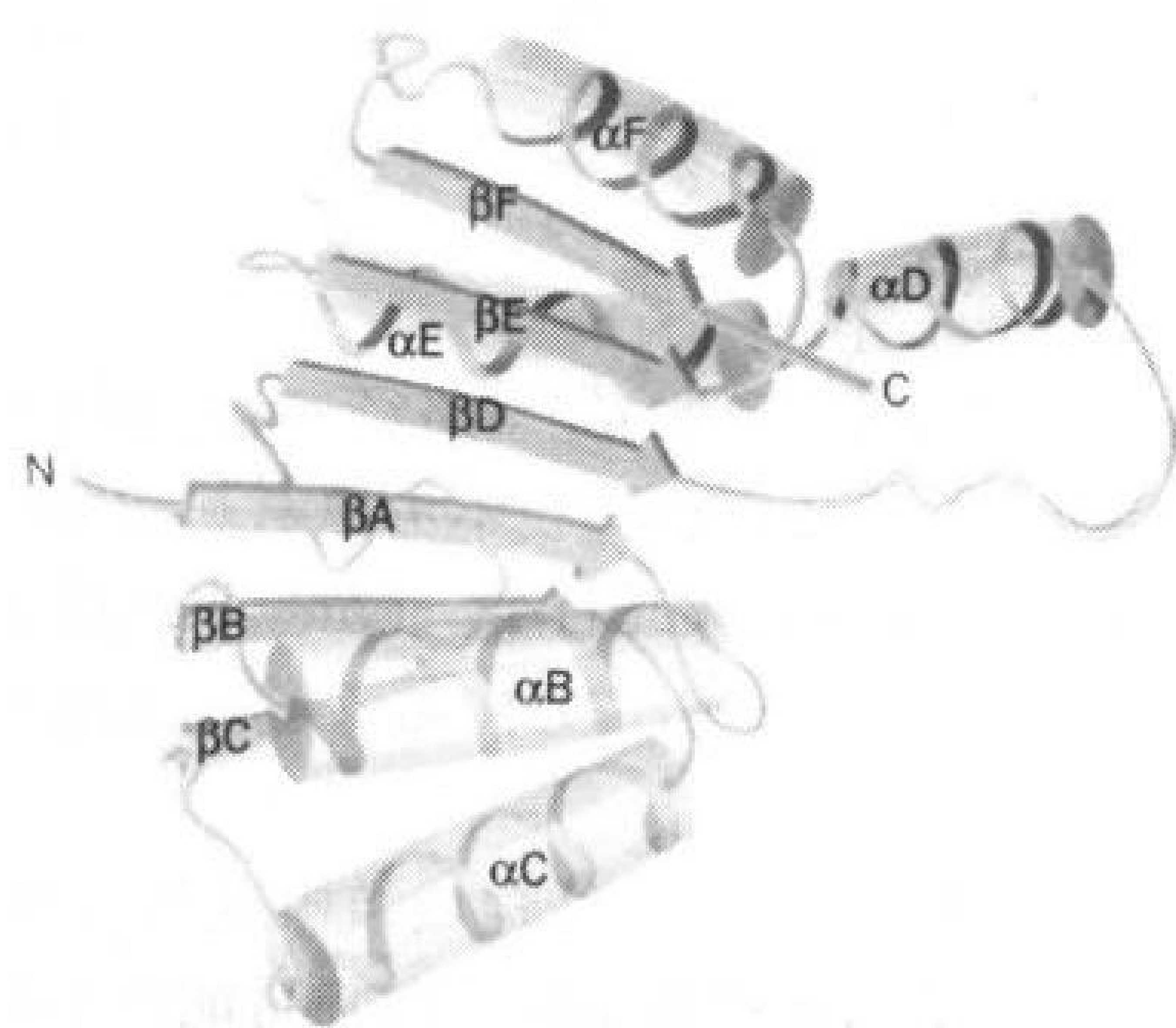


图 6-29　理想化的二核苷酸结合(Rossman 折叠)

两个结构相同的 βαβαβ 单元(黄色和蓝色)每个都能结合二核苷酸 NAD^+(未显示)的一部分。[引自 Rossman, M.G., Liljas, A., Branden, C.-I., and Banaszak, L.J., in Boyer, P.D. (Ed), The Enzymes, Vol.11 (3rd ed.), P.68, Academic Press (1975)]

146

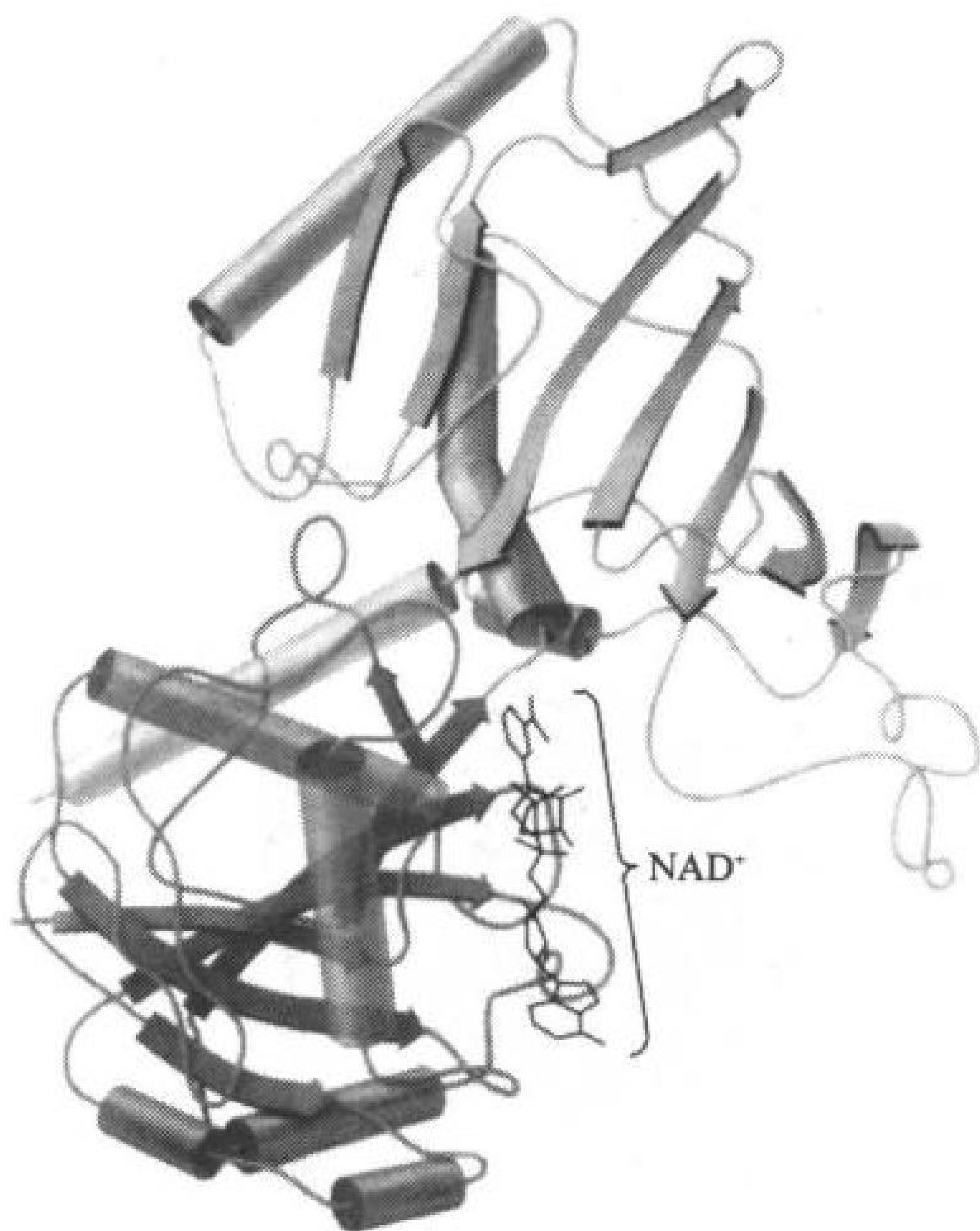


图 6-30 双结构域蛋白质 3-磷酸甘油醛脱氢酶 第一个结构域(红色)结合 NAD^+(黑色),第二个结构域(绿色)结合 3-磷酸甘油醛脱氢酶(未显示)。[引自 Biesecker, G., Harris, J. I, Thierry, J. C., Walker, J. E., and Wonacott, A., Nature 266, 331(1997)]

大肽链形成结构域

大于 200 个残基的多肽链常会折叠成两个或多个球状团簇,称为**结构域**(domain),使蛋白质看上去呈两叶或多叶状。多数结构域由 100～200 个氨基酸残基组成,平均直径约 25Å。例如,**3-磷酸甘油醛脱氢酶**的每个亚基都有两个不同的结构域(图 6-30)。肽链在结构域内部前后蜿延,而相邻结构域之间仅由一、两条多肽片段相连。*许多结构域是具有小型球蛋白特征的独立结构单元*。总的来说,结构域之间产生大量的相互接触,使蛋白质看上去还是一个球状整体。所以,蛋白质的结构域不一定十分明显。

观察本章图示的各种不同蛋白质结构表明:结构域由两层或两层以上的二级结构元件构成,原因很明显,至少必需两层才能封闭结构域的疏水核,使其避开水相环境。

结构域常有特殊功能,如结合小分子。在图 6-30 中,NAD^+ 结合在 3-磷酸甘油醛脱氢酶的第一个结构域(注意其二核苷酸结合团)。在多结构域蛋白质中,结合位点常位于结构域之间的裂隙中,即小分子结合在来自两个结构域的基团上。这种情况下,结构域间较为柔性的共价连接,允许蛋白质与小分子间柔性的相互作用。

C. 蛋白质家族

通过研究肽链延伸的完整路径,我们可将数千个已知的蛋白质结构,其中包含甚至数目更多的独立结构域,组成家族。在不考虑氨基酸序列和存在表面环的情况下,比较折叠模式,那么独特结构域的数目落到仅几百个。(虽然不是所有蛋白质结构都为人所知,但是据估计,独特的天然蛋白质结构域总数不超过 1000 个。)令人惊奇的是,大约有一半的已知结构都落在几十种折叠模式中。

对于有限数目的已知结构域结构存在几种可能的解释。有限数目可能反映了数据库偏差,也就是说,对已知蛋白质结构的收集可能并不是所有蛋白质结构的代表性样本,随着已测定蛋白质结构数量的迅速增加,这种可能性也越来越小。更可能的是,共同的蛋白质结构可能是进化的结果——结构域,结构域产生并得以保持的原因在于它们有以下几种能力:①形成稳定折叠模式;②耐受氨基酸的缺失、替换和插入,因而更可能在进化变异中生存;③支持基本的生物功能。

147

序列相似的肽链趋向于具有相似的骨架构象,这对行使类似功能的进化相关蛋白肯定是正确的。例如,不同物种的细胞色素 *c* 是高度保守的蛋白质,具有非常相似的序列(表 5-6)和三维结构。

细胞色素 *c* 仅存在于真核生物中,但原核生物也含有一种叫作 ***c* 类细胞色素**(*c*-type cytochromes)的蛋白质,执行同样的功能(电子传递)。不同种属的 *c* 类细胞色素其序列相似性很

低,与真核细胞色素 c 在序列上也不太相似,然而它们的 X 射线结构却很相似,特别是在肽链折叠和侧链内部堆积方式方面非常接近(图 6-31),主要结构差异在表面环区。c 类细胞色素的序列已经趋异,若没有 X 射线结构,只能使用最近发展的复杂的计算机数学程序才能将它们对齐。所以,进化过程中蛋白质的基本结构和功能单元是保守的,而氨基酸残基不一定保守。

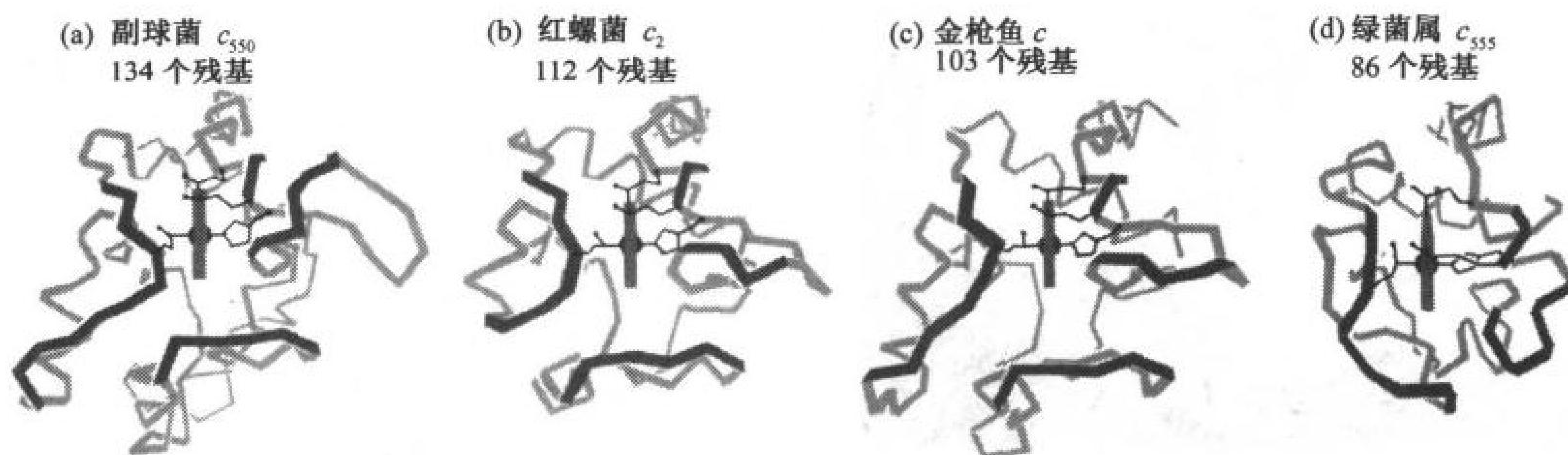


图 6-31　c 类细胞色素的三维结构

以同样的走向显示各多肽骨架(蓝色),这样它们的血红素(红色)都显示一条边,将血红素共价连接在蛋白质上的 Cys、Met 和 His 侧链也在图中显示。(a)副球菌脱氮体(*Paracoccus denitrifican*)细胞色素 c_{550}(134 个残基)。(b)红螺菌属红核(*Rhodospirillum rubrum*)细胞色素 c_2(112 个残基)。(c)金枪鱼细胞色素 c(103 个残基)。(d)硫代硫酸绿菌属(*Chlorobium thiosulfatophilum*)细胞色素 c_{555}(86 个残基)。(引自 Irving Geis)

在功能相关的远缘蛋白质中,结构相似性也是非常普遍的。例如,参与各种不同代谢过程的许多 NAD^+ 结合酶都含有相似的二核苷酸结合团(见图 6-30)。它们和不同的结构域耦合,执行特定的酶反应。

3. 四级结构与对称性

大多数蛋白质,特别是那些分子质量大于 100kDa 的蛋白质,都含有多条肽链,这些肽链亚基以特殊的几何方式结合。这些亚基的空间排列方式称为蛋白质的四级结构。

多亚基蛋白质普遍存在的原因有多种。在大的蛋白质装配中,如胶原纤维,与合成一条很长的肽链相比,多亚基方式的好处就像建筑上常用的预制件,简单地替换有缺陷的亚基就能修复整个蛋白质;决定亚基形成的位点与装配最终蛋白质的位点可以不同;决定整个蛋白质必需的遗传信息只需要几个不同的自组装亚基的信息即可。对酶来说,增大蛋白质可更好地固定其反应基团的三维空间位置。用相同亚基的缔合以增大酶比增加肽链长度更有效,因为每个亚基都有一个活性位点。更重要的是,许多酶的亚基构成提供了它们活性调节的结构基础(节 7-2E,节 12-3)。

148

亚基的缔合通常是非共价性的

多亚基蛋白质可包含相同或不同的肽链。例如,血红蛋白的亚基成分是 $\alpha_2\beta_2$(图 6-32)。含有多于一个亚基的蛋白质称**寡聚物**(oligomer),其相同的单元称**原聚体**(protomer)。这样,一个原聚体可能由一条肽链或几条不同肽链组成,从这个意义上说,血红蛋白就是由 $\alpha\beta$ 原聚体组成的二聚体。

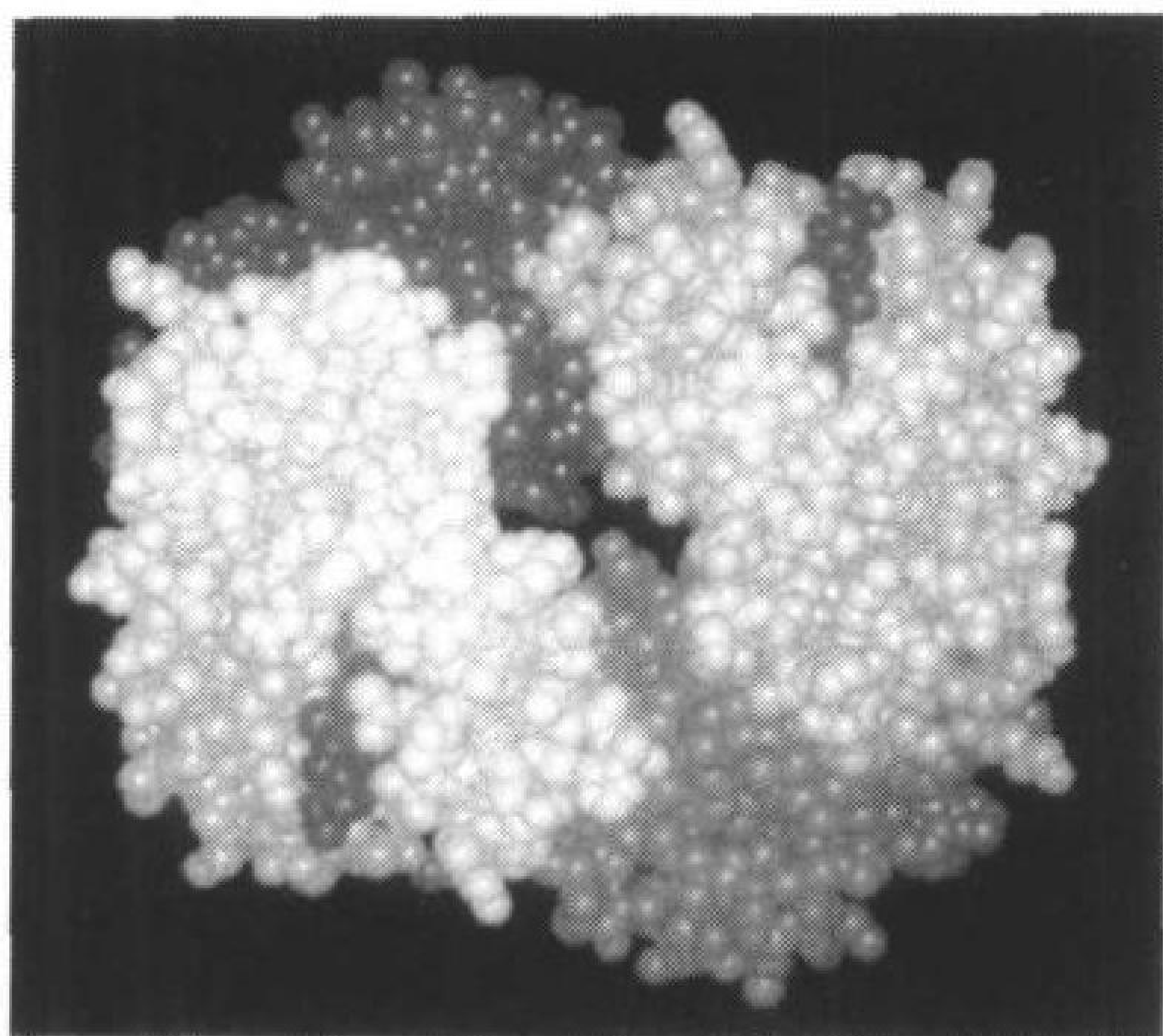


图 6-32 血红蛋白的四级结构
在此空间填充模型中，黄色、绿色、青色和蓝色分别代表 α_1、α_2、β_1 和 β_2 亚基。红色为血红素。

亚基间的接触区与单亚基蛋白质的内部很相似，它们包含致密堆积的非极性侧链、骨架氢键和侧链氢键，有时还有链间二硫键。

亚基的对称性排列

在大多数寡聚蛋白质中，原聚体是对称排列的，即，每个原子在寡聚物中占据一个几何等同的位置。蛋白质不可能有反转或镜向对称，因为使原聚体重合需要将 L 型残基转变为 D 型残基。所以，蛋白质只可能具有**旋转对称性**(rotational symmetry)。

在最简单的旋转对称，即**循环对称**(cyclic symmetry)中，原聚体间由单一旋转轴相关联(图 6-33a)。具有二度、三度或 *n* 度对称轴的物体分别称为 C_2、C_3、C_n 对称。C_2 对称最为常见，再高级的旋转对称较少见。

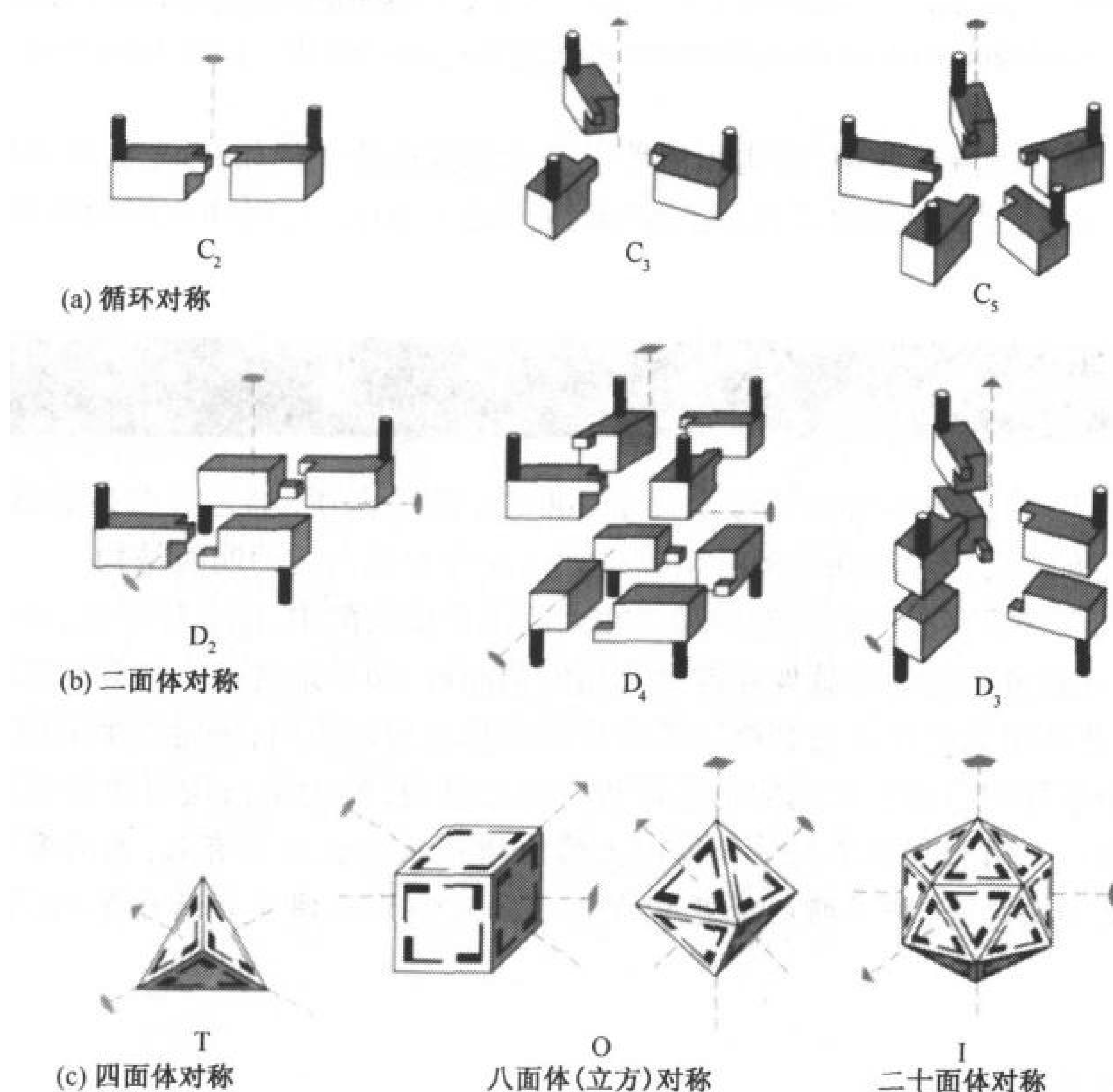


图 6-33 寡聚蛋白质的一些对称性
绿色虚线末端的椭圆、三角、正方和五边形分别表示物体的二度、三度、四度和五度旋转轴。(a)旋转对称(C)装配。(b)二面体对称(D)装配，在这些对称体中，2 度轴垂直于另一旋转轴。(c)四面体旋转对称(T)装配、立方或八面体(D)旋转对称装配、二十面体(I)旋转对称装配。(引自 Irving Geis)

二面体对称(dihedral symmetry, D_n)是一种更复杂的旋转对称,由 n 度旋转轴与二度旋转轴垂直交叉而产生(图 6-33b)。具有 D_n 对称的寡聚物包含 $2n$ 个原聚体,D_2 对称是蛋白质中最常见的二面体对称。

其他可能的旋转对称有四面体、立方体以及二十面体对称(图 6-33c)。一些多酶复合物和球状病毒是建筑在这类几何平面上的。

4. 蛋白质折叠与稳定性

热力学测量表明,在生理条件下天然蛋白质仅勉强稳定,这一点看上去可能会令人不可思议。使蛋白质变性所需的自由能每个氨基酸残基为约 0.4kJ·mol^{-1},因此一个 100 残基完全折叠的蛋白质仅比它们去折叠形式稳定约 40kJ·mol^{-1}的自由能(作为比较,断开一个典型氢键需要的能量约 20kJ·mol^{-1})。在整个蛋白质分子中,各种对蛋白质的非共价影响——疏水效应、静电作用和氢键——都具有能量,总计可能有每分子几千焦耳的能量。蛋白质结构是这些相互抵消作用微妙平衡的结果。本节讨论稳定蛋白质结构的作用力和蛋白质到达最稳折叠态的过程。 149

A. 稳定蛋白质结构的作用力

蛋白质结构主要决定于疏水效应,极性残基间的相互作用和其他形式的键也在较低程度上起作用。

疏水效应

导致非极性物质与水最小化接触的疏水效应(节 2-1C)是天然蛋白质结构的主要决定因素。非极性侧链在蛋白质内部聚积得益于水分子的熵增加,否则水分子会在疏水基团周围形成一个有序的"笼"。蛋白质中氨基酸残基的疏水趋向称为**疏水度**(hydropathy)(表 6-2)。侧链的疏水度越大,越容易占据蛋白质内部,反之则在蛋白质表面。疏水度是一个很好的指标,可用于预测肽链的哪些部分在蛋白质内部避开水溶剂,哪些部分在蛋白质外表(图 6-34)。 150

表 6-2　氨基酸侧链的疏水度

侧　链	疏水度	侧　链	疏水度
Ile	4.5	Trp	-0.9
Val	4.2	Tyr	-1.3
Leu	3.8	Pro	-1.6
Phe	2.8	His	-3.2
Cys	2.5	Glu	-3.5
Met	1.9	Gln	-3.5
Ala	1.8	Asp	-3.5
Gly	-0.4	Asn	-3.5
Thr	-0.7	Lys	-3.9
Ser	-0.8	Arg	-4.5

来源:Kyte. J. and Doolittle. R. E., J. Mol. Biol. 157, 110(1982)。

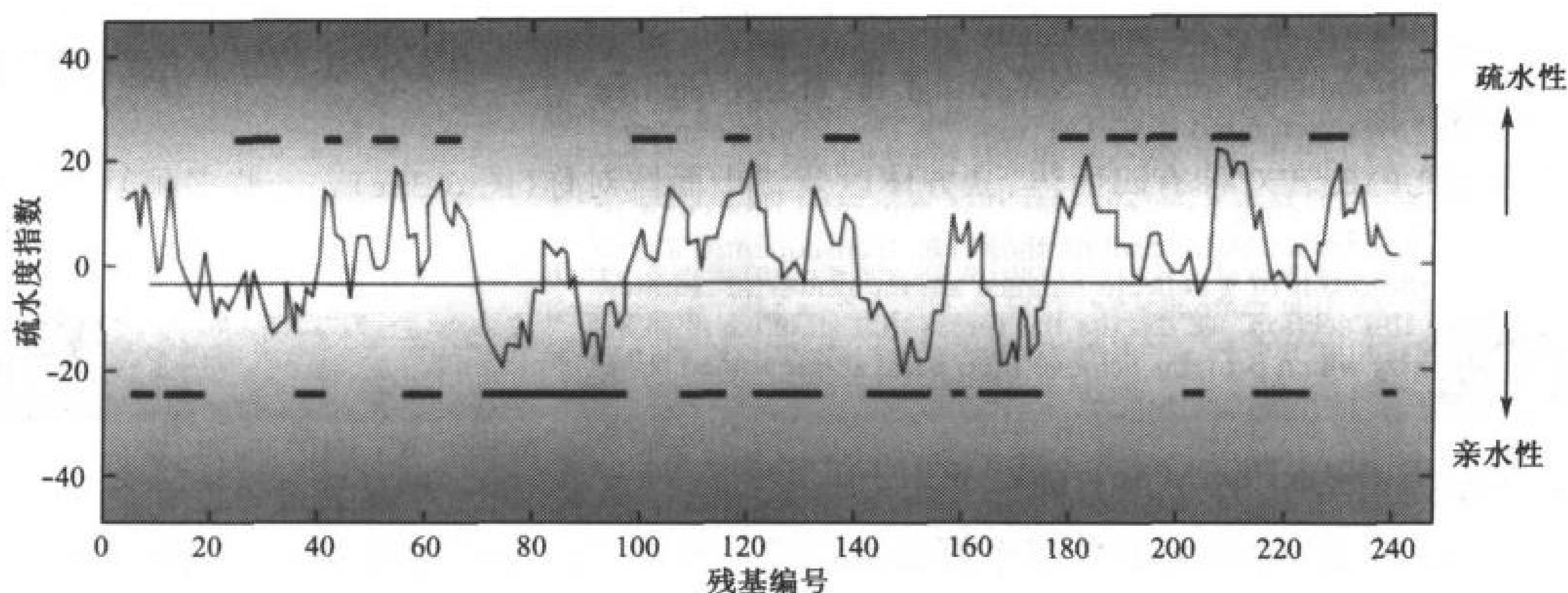


图 6-34 牛胰凝乳蛋白酶原的疏水度指数

9 个连续残基的疏水度之和对残基序号作图。正疏水度指数代表肽链的疏水区，而较大的负值代表亲水区。上划线表示由 X 射线测定的蛋白质的内部区域，下划线表示蛋白质的外部区域。[引自 Kyte, J. and Doolittle, R.F., J.Mol. Biol. 157,111(1982)]

静电作用

在致密堆积的天然蛋白质内部，相对较弱的范德华力(节 2-1A)也是一个重要的稳定因素。因为这种作用仅在短距离内起作用，当去折叠时就随之消失了。

可能让人意想不到的是，*作为蛋白质结构主要特征的氢键对稳定性只有很小的贡献*。这是因为去折叠蛋白质中，氢键键合的基团与水分子形成了能量相当的氢键。尽管这样，氢键仍然是天然蛋白质结构的重要决定因素，因为，如果蛋白质以一种阻碍氢键形成的方式折叠，就会失去这部分来自氢键的稳定能量。所以，氢键从少数几个由疏水作用稳定的构象中"选择"蛋白质独特的天然构象，对三级结构进行微调。

两个带相反电荷的离子化基因(如 Lys、Asp)的结合称为**离子对**(ion pair)或**盐桥**(salt bridge)。蛋白质中大约 75%带电荷残基是位于蛋白质表面的离子对成员，尽管带相反电荷的离子对成员之间有很强的静电引力，但这对天然蛋白质的稳定性几乎没有贡献，这是因为离子对的电荷-电荷相互作用的自由能通常都无法补偿荷电基团形成离子对时侧链的熵损失以及溶剂化的自由能损失。这可以解释同源蛋白质中离子对的保守性很低的现象。

151

化学交联

在蛋白质折叠成天然构象时，肽链内及链间的二硫键(图 4-6)就形成了。有些多肽在 Cys 残基被衍化而不能形成二硫键的情况下，仍然采取具有完全活性时的构象，这说明二硫键不是必需的稳定作用力，而作用可能在蛋白质从全伸展状态向成熟态转变中"锁定"某种特定的骨架折叠模式中有重要作用。

二硫键在胞内蛋白质中很少见，因为细胞质是一个还原环境。大多数二硫键出现在蛋白质由细胞分泌到更氧化的胞外环境后，相对较严酷的胞外环境(如多变的温度和 pH)显然需要二硫键来保证更多的结构约束。

金属离子也具有在蛋白质内部交联的功能。例如，已经在核酸结合蛋白中发现了至少 10 个

被统称为“**锌指**”(zine finger)的基序。这些结构都约含 25～60 个残基,分布在两个 Zn^{2+} 离子周围, Zn^{2+} 与 Cys、His 的侧链,有时也可和 Asp 的侧链形成四面体配位(图 6-35)。Zn^{2+} 允许较短的多肽片段折叠成可与核酸作用的稳定单元,这种锌指单元太小,如果没有 Zn^{2+} 的存在就不稳定。锌特别适合于在胞内蛋白质中起结构作用:其填满的 d 电子层能与来自不同氨基酸残基的各种配基(如硫、氮、氧)起强作用。此外,锌只有一个稳定的氧化态(不像铜或铁),因此,它在细胞中不发生氧化-还原反应。

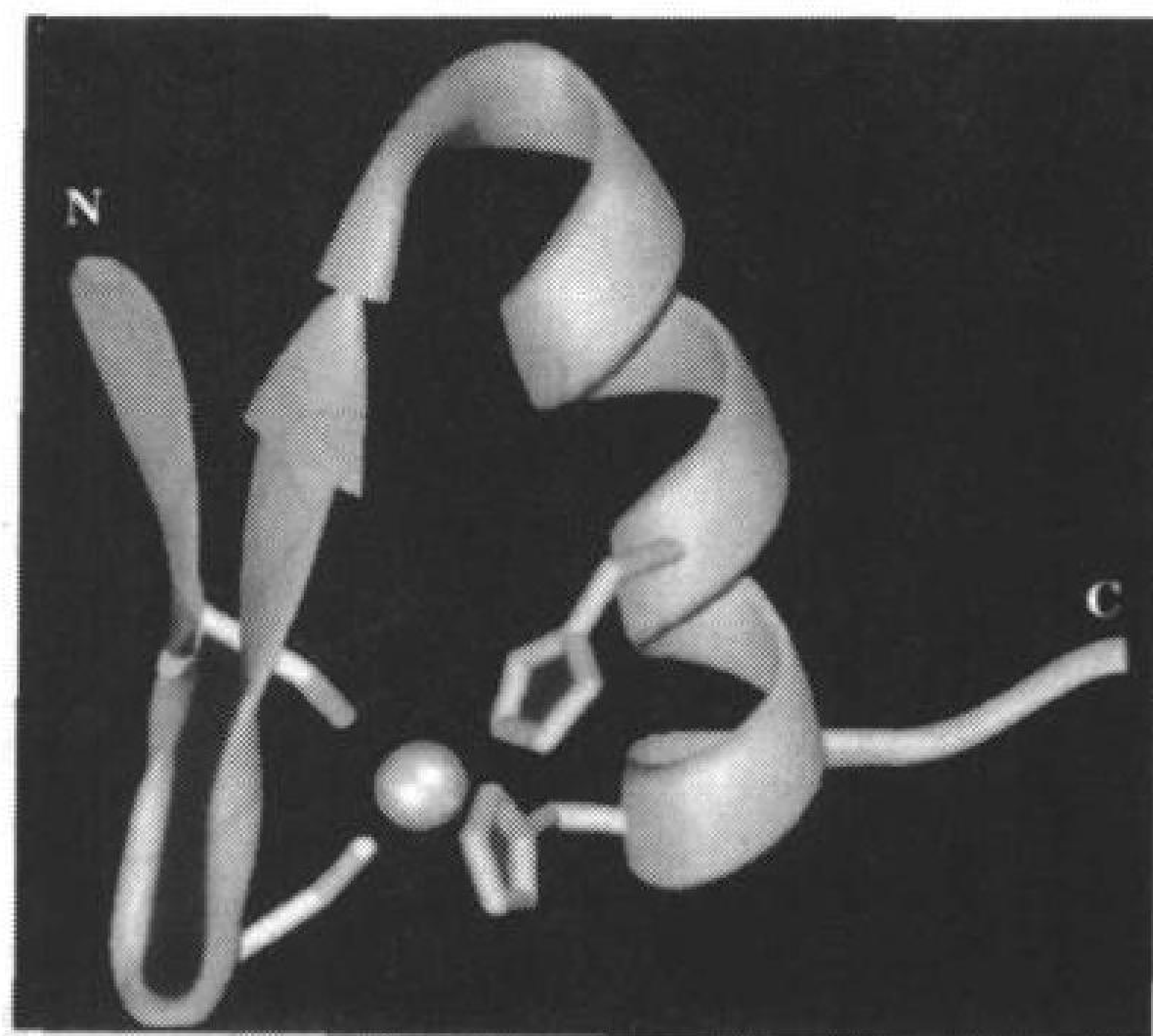


图 6-35　锌指基序

该结构取自 DNA 结合蛋白 Zif268,称为 Cys_2-His_2 锌指,因为锌原子(银色)和两个 Cys 残基(黄色)两个 His 残基(青色)配位。(基于 Carl Pobo, MIT 的 X 射线结构)

B. 蛋白质变性与复性

天然蛋白质的构象稳定性不高,容易变性。变性就是维持天然构象的弱非共价键力之间平衡的改变。很多物质和条件都可使蛋白质变性。

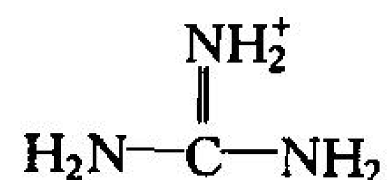
1)加热会导致蛋白质的构象敏感性质如旋光(节 4-2)、黏滞性和 UV 吸收等在很小的温度变化范围内发生很大的变化。这种陡峭的转变表明整个肽链的**协同性**(cooperatively),亦即几乎同时去折叠或“融化”;多数蛋白质的融点低于 100℃,生存在近 100℃ 的热泉或海底火山口的有机体——嗜热细菌的蛋白质是例外。奇怪的是,这些热稳定蛋白质的 X 射线结构与它们的低温同源类似物的结构只有微小的差别。

2)pH 的变化改变了氨其酸侧链的离子化状态,因而也改变了蛋白质的电荷分布和氢键需求。

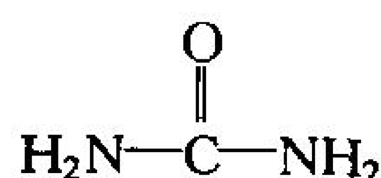
3)去污剂可与蛋白质的非极性残基结合,从而干扰决定蛋白质天然结构的疏水作用。

4)**离液剂**(chaotropic agent)胍基离子和尿素,在 5～10mol·L^{-1}范围内是蛋白质变性最常用的试剂。离液剂是增加非极性物质在水中溶解度的离子或有机小分子。它们作为变性剂的有效性源于其破坏疏水作用的能力,目前对它们的作用机制还不甚了解。

152



胍基离子



尿素

变性蛋白质可以复性

1957 年,Christian Anfinsen 对**核糖核酸酶 A**(RNase A)的巧妙实验证明蛋白质可以被可逆变性。RNase A 是一个含 124 个残基的单链蛋白质,在含 2-巯基乙醇的 8mol/L 尿素溶液中折叠完全解开,4 个二硫键也被还原断裂(图 6-36)。透析去除尿素和还原剂,并将所得溶液置于 O_2 及 pH8 条件下(氧化巯基,形成二硫键),结果产生的蛋白质具有 100% 的酶活力,并且与天然 RNase A 在物理性质上没有差别,说明该蛋白质必定自发地**复性**(renature)了。

RNase A 的复性需要重建 4 个二硫键。8 个 Cys 残基中某个 Cys 与另外 7 个 Cys 之一随机

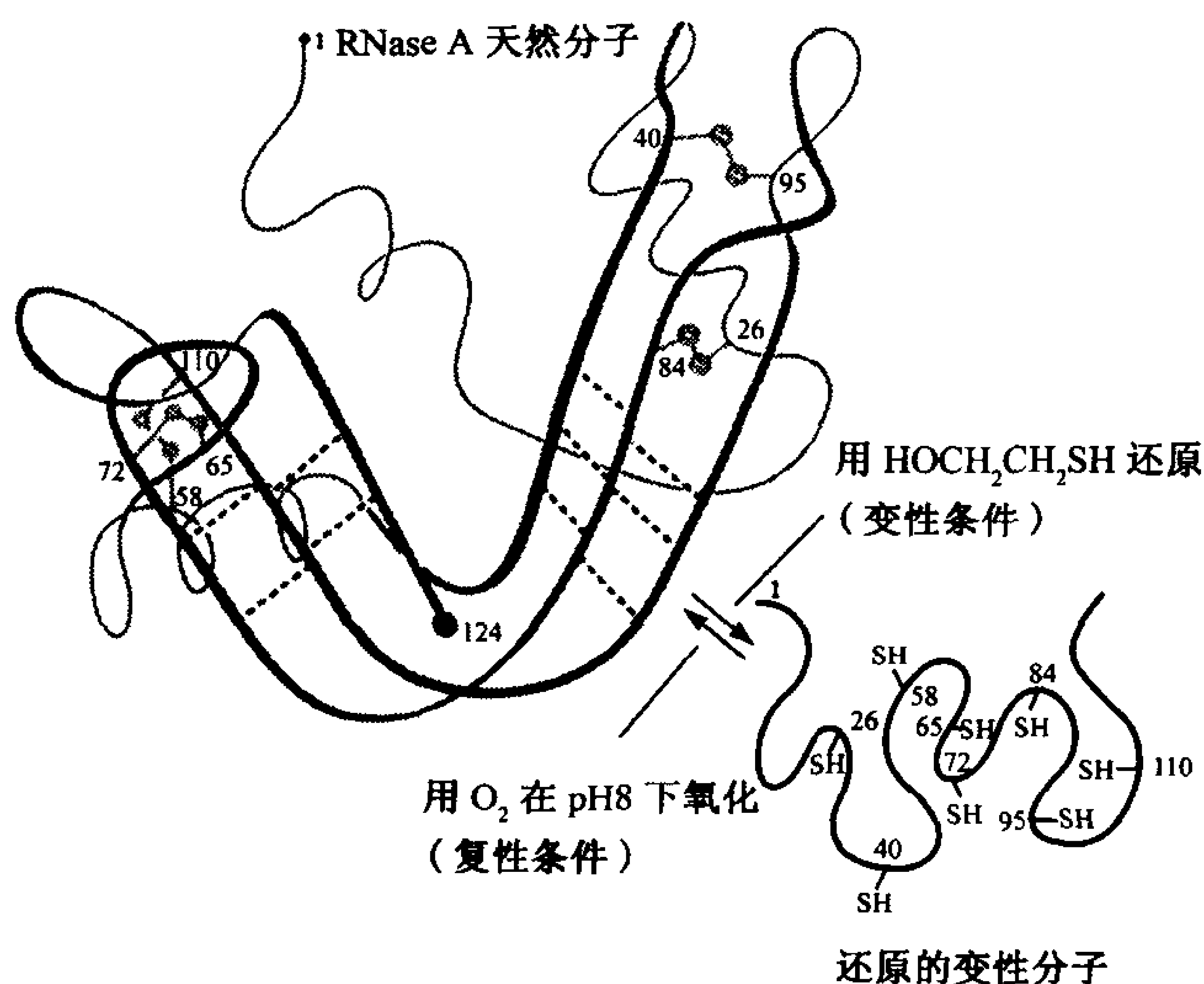


图 6-36 RNase A 的还原变性和氧化复性
（引自 Irving Geis）

正确配对的概率是 1/7，剩下的 6 个 Cys 中的一个继续随机配对，正确的概率为 1/5；以此类推，RNase A 随机重建全部 4 个天然二硫建的总概率是：

$$1/7 \times 1/5 \times 1/3 \times 1/1 = 1/105$$

很明显，二硫键在复性条件下并不是随机重建的，因为如果重建是随机发生的话，那么仅有 1% 重折叠蛋白质具有催化活性。确实，若 RNase A 在 $8 mol \cdot L^{-1}$ 尿素中氧化，肽键呈无规卷曲构象时二硫键重新形成，去除尿素后，RNase A 如所预期的只有约 1% 的活性。这种“被搅乱”的蛋白质能够通过加入 2-巯基乙醇来断开错配二硫键，再形成正确二硫键，从而恢复其全部活性。Anfinsen **的工作表明蛋白质在生理条件下能够自发折叠成其天然构象。这意味蛋白质的一级结构决定其三级结构。**

153

C. 蛋白质折叠途径

蛋白质稳定性和复性的研究表明：蛋白质的折叠主要是由占据折叠蛋白质内部的残基支配的。蛋白质是如何折叠成其天然构象的呢？可以设想：蛋白质可能通过不断地随机探索各个可能的构象，直到偶然碰上正确的构象为止。然而由 Cyrus Levinthal 首先做的一个简单计算证明情况不可能是这样：对于一个由 n 个残基组成的蛋白质，假设其 $2n$ 个旋转角 ϕ、ψ（注：原文中误写成 2^n 个旋转角）每个角有 3 个稳定构象，则将产生 $3^{2n} \approx 10^n$ 个可能的构象（仅是一个粗略的低估，因为侧链都未考虑在内）。假如蛋白质每 10^{-13}s 能搜索一个新构象（单键重新取向的速率）的话，那么搜索所有可能构象所需的时间 t 则为：

$$t = 10^n / 10^{13} \text{s}$$

对于含 100 个残基的蛋白质，$t = 10^{87}$s，远大于宇宙表观年龄（200 亿年，或 6×10^{17}s）。

事实上，很多蛋白质在不到几秒钟的时间内就折叠成天然构象，原因是**蛋白质是沿着指定的途径折叠成其天然构象的，而不是通过随机构象搜索碰到的。**这样，当蛋白质折叠时，其构象稳

定性突然增加(即自由能迅速下降),使折叠呈单向过程。一个假设的折叠途径示于图 6-37。

实验指出,蛋白质折叠始于局部二级结构(α 螺旋和 β 折叠)的形成,这个折叠早期的步骤极其迅速,小蛋白中大多数天然二级结构在折叠起始的 5ms 内就已形成。因为天然蛋白质含有致密的疏水核,因此很可能蛋白质折叠的推动力就是被称为**疏水坍陷**(hydrophobic collapse)的作用,该坍陷态称为**融球**(molten globule),是一类拥有天然蛋白大部分二级结构但几乎没有其三级结构的物质;在接下来的 5～1000ms 中,二级结构稳定下来并开始形成三级结构。在这中间阶段,类天然元件被认为是采用亚结构域形式,亦即尚未正确对接形成结构域。在折叠的最后阶段,对单结构域的小蛋白质来说就发生在接下来的几秒钟里,蛋白质进行一系列的复杂运动,完成内部侧链较为刚性的堆积和氢键的形成,并将剩余的水分子排出疏水核。

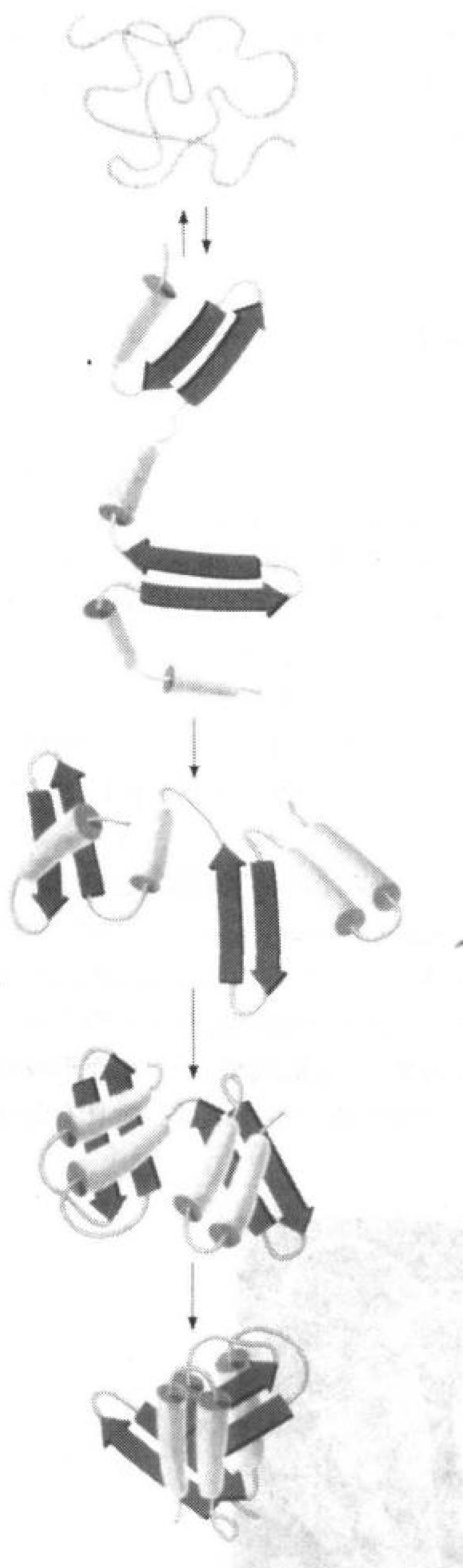


图 6-37　假设的蛋白质折叠途径

本例显示具有两个结构域的蛋白质的线性折叠途径。[引自 Goldberg, M.E., Trends Biochem. Sci. 10, 389 (1985)]

在多结构域和多亚基蛋白质中,各自的单元接着以类似的方式装配,进行一些必需的微小构象调整,形成蛋白质的天然三级结构或四级结构。总之,蛋白质表现出一种层次折叠的方式,先形成小的局部结构元件,然后聚积成较大的结构元件,它们之间再进一步形成更大的结构元件

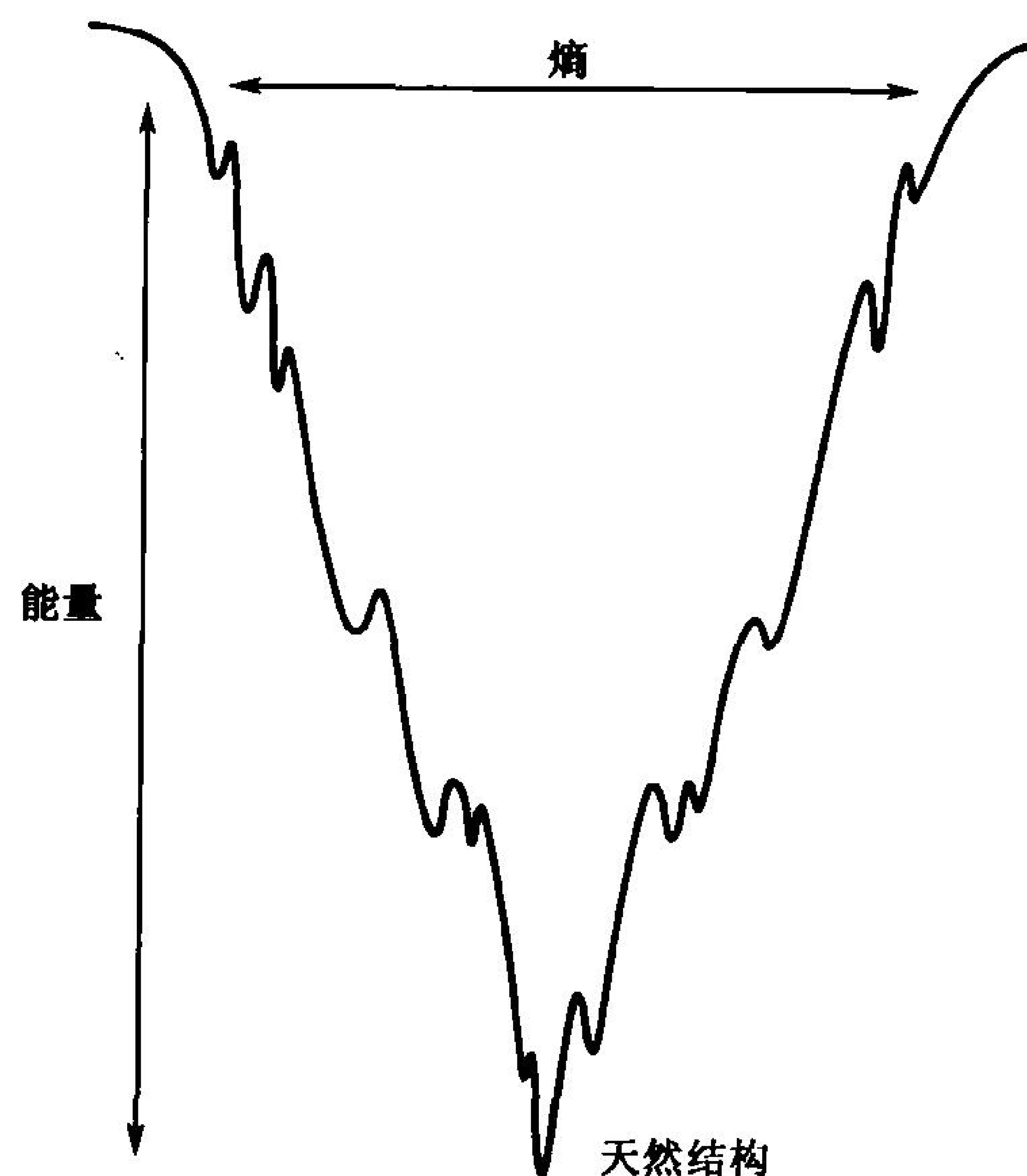


图 6-38　蛋白质折叠的能-熵图

宽度代表熵,深度代表能量。去折叠多肽从高熵、无序态(宽端)向单个低熵(窄端)、低能的天然构象行进。[引自 Onuchic, J.N., Wolynes, P.G., Luthey-Schulten, Z., 和 Socci, N.D., Proc. Natl. Acad. Sci. 92, 3636 (1965)]

等。

折叠也像变性一样，是协同过程，结构小元件的形成加速更多结构的形成。一个折叠蛋白必定由高能、高熵态向低能、低熵态行进，这种能-熵关系见示意图6-38。去折叠多肽有很多可能的构象（高熵），随着它向可能构象数目不断减少的构象折叠，其熵和自由能都在降低。能-熵图不是平滑的谷，而是锯齿形状，少数裂口和浅谷代表暂时性陷入的构象，通过随机热运动的激活，它们克服一个稍微“上坡”形的自由能能垒，然后继续向低能构象行进。显然，*蛋白质已进化到具有高效的折叠途径和稳定的天然构象*。尽管如此，蛋白质错折叠在自然界中仍然确有发生，这些错误折叠的积累是导致多种神经疾病（框6-4）的原因。

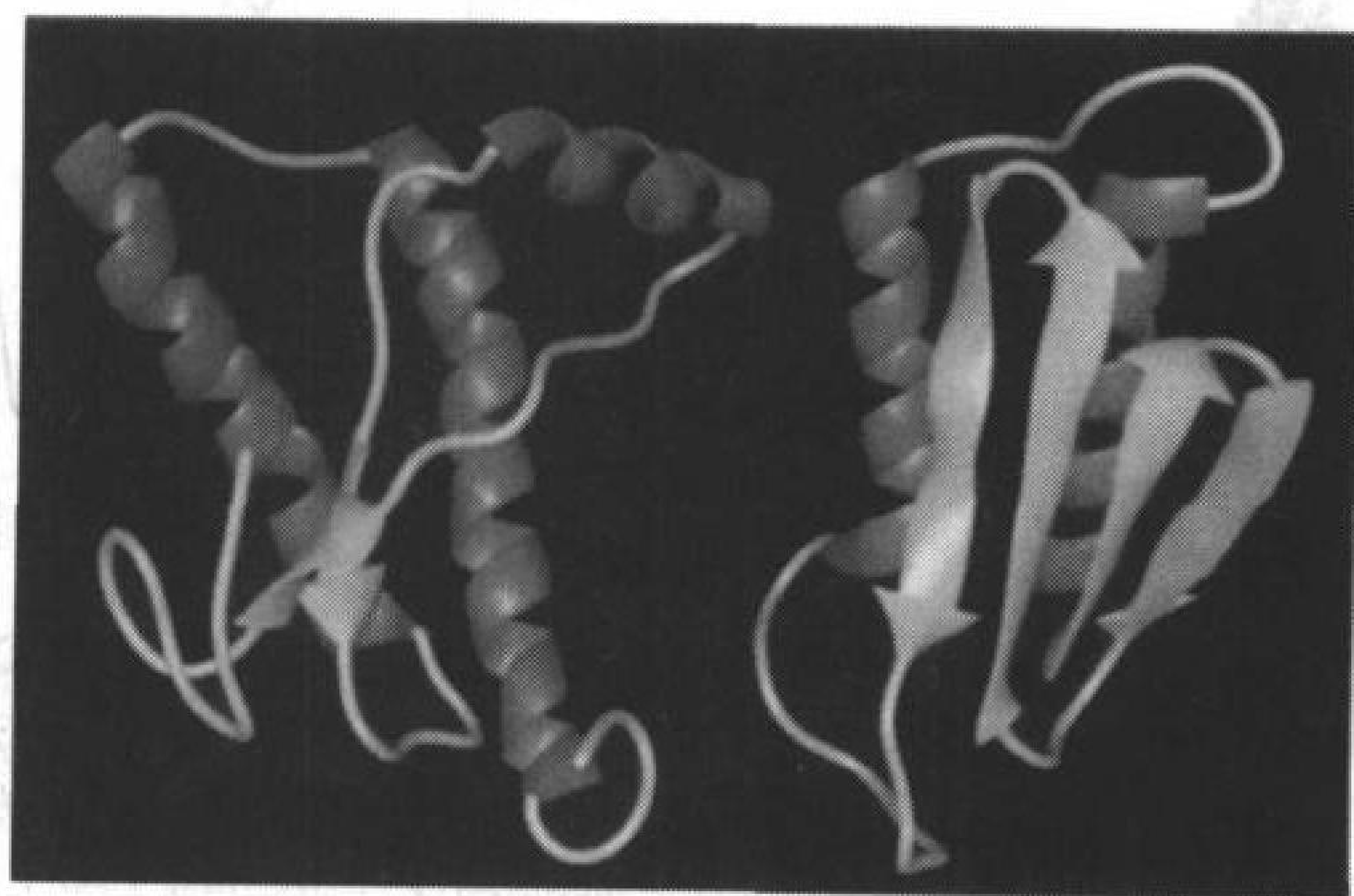
框6-4 健康和疾病的生物化学

和蛋白质折叠相关的疾病

某些神经疾病是以不溶性蛋白质在脑中或其他组织中的聚积为特征的，称为淀粉样沉积（amyloid deposit）。这些疾病，包括最常见的阿尔茨海默病（Alzheimer's disease），起因于一类蛋白质的沉积。蛋白质化学家对部分折叠的多肽在体外无选择地沉淀较熟悉，可能是由于疏水部位的暴露。有些奇怪的是，许多其他蛋白质在体内以高浓度存在，但部分折叠的蛋白质分子只和相同蛋白质分子相聚集。更奇怪的是，这些沉积的分子显然就是那些正常存在于同一组织中的分子的错误折叠形式。

β淀粉样蛋白（β amyloid protein）在阿尔茨海默氏病人脑中形成纤维沉积，或瘢块（plaque），它是从其前体蛋白质上裂解下来的一个40个残基的片段，它的正常功能尚不清楚。前体的某些突变会增加β淀粉样蛋白产量。肽浓度的增加明显增大了错误折叠肽起始聚积的可能性，最终产生淀粉样瘢。淀粉样瘢看来是神经退化性疾病的主要原因而不是副作用。

蛋白质的非正常折叠几乎肯定是一类传染性疾病的致病因素，这类疾病包括牛海绵状脑病（bovine spongiform encephalopathy）（“疯牛病”）、羊瘙痒病以及克-雅病（Greutzfeldt-Jacob disease）在内的好几种罕见的致命性人类疾病。根据 Stanley Prusiner 提出的假设，这些疾病是由一种称为朊病毒（prion）的蛋白质引起。朊病毒蛋白质存在于正常脑组织中，主要是α螺旋构象（左边的结构模型，利用结构预测技术获得）。在病脑中，同样的蛋白质——变成β折叠与α螺旋的混合物（右边的模型）——从而形成损坏脑细胞的不溶性纤维聚积物。人们认为朊病毒的感染性是因为异常折叠的朊病毒蛋白质具有催化正常朊病毒蛋白质错误折叠的能力。



（引自 Fred Cohen, University of California at San Francisco）

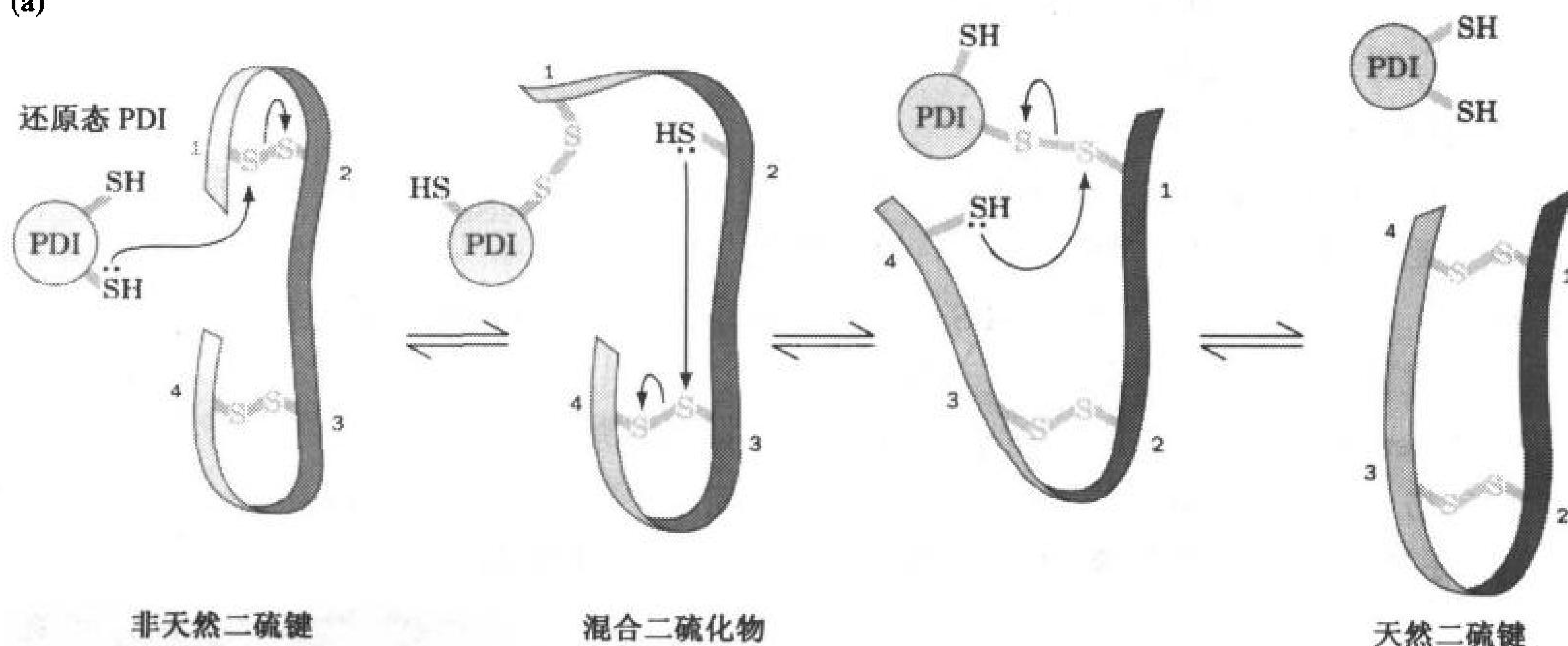
蛋白质二硫键异构酶

即使在最适实验条件下,体外蛋白质折叠也常常比体内折叠慢。原因之一是体外折叠常会形成天然蛋白质中并不存在的错配二硫键,这些二硫键然后通过二硫键交换而缓慢地形成天然二硫键。**蛋白质二硫键异构酶**(protein disulfide isomerase, PDI)催化二硫键交换这一过程。确实,正是观察到 RNase A 在体内折叠大大快于体外折叠,才使得 Anfinsen 发现了这个酶。

PDI 可通过其表面的疏水斑结合在多种去折叠的多肽上,PDI 的 Cys—SH 与多肽的二硫键反应形成一个混合二硫键和一个多肽 Cys—SH(图 6-39a),该 Cys—SH 攻击另一个由于自发折叠而带到它邻近的二硫键;新近释放的 Cys—SH 然后与另一个二硫键重复同样的过程,如此继续,最后产生仅含天然二硫键的多肽和再生的 PDI。

氧化态(含二硫键的)PDI 还以类似的方式催化多肽链二硫键的起始形成(图 6-39b)。在这种情况下,还原态 PDI 反应产物必须由细胞中的氧化物重新氧化,才能保证此过程的反复进行。

(a)



(b)

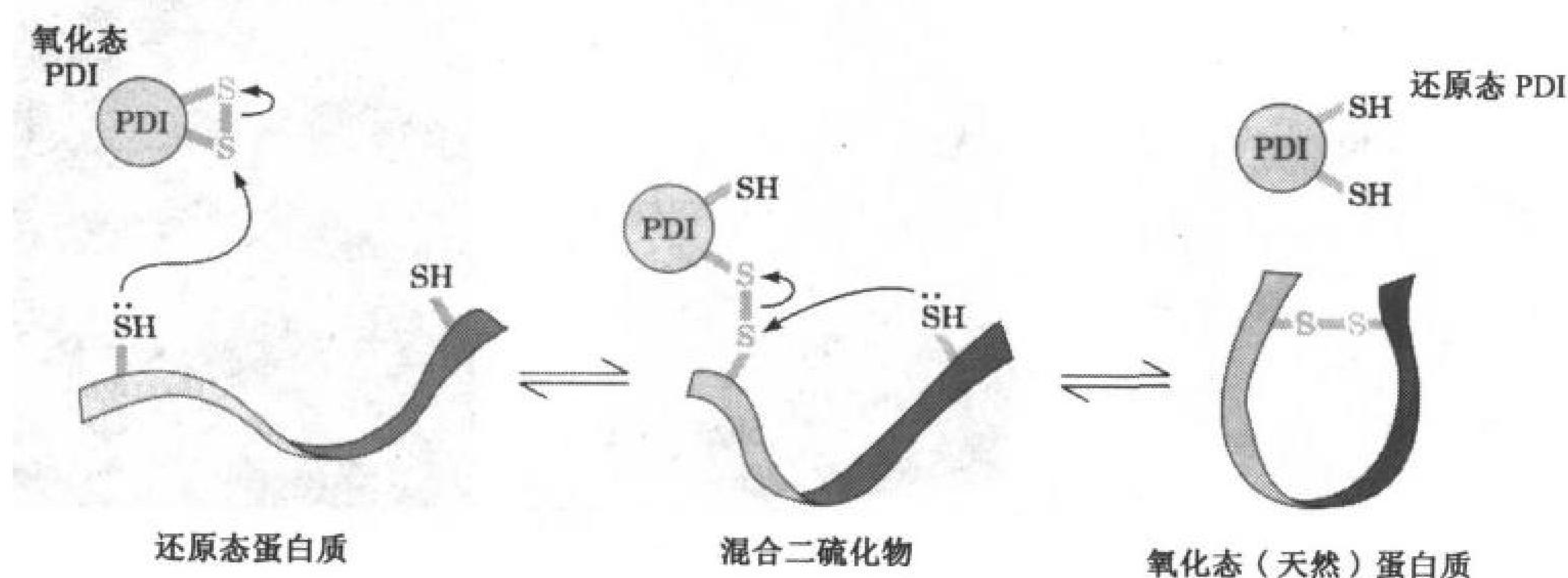


图 6-39　蛋白质二硫键异构酶作用机制

(a)还原态 PDI(含—SH)通过二硫键交换反应催化多肽非天然二硫键重排,以产生天然二硫键。(b)氧化态 PDI(含二硫键)通过形成混合二硫键,催化多肽二硫键的起始形成。还原态 PDI 可与细胞内氧化物反应再生氧化态 PDI。

分子伴侣

蛋白质在合成时就开始折叠，因而变性蛋白质的体外复性并不能模仿蛋白质的体内折叠。此外，蛋白质的体内折叠是在很高浓度的其他蛋白质存在时进行的，这些蛋白质也可能与折叠蛋白质相互作用。**分子伴侣**(molecular chaperone)*是结合去折叠和部分折叠肽链的必需蛋白质，以防裸露疏水片段不恰当地结合，疏水片段的缔合会导致非天然折叠、多肽的聚集和沉淀。*这对多结构域、多亚基蛋白质尤其重要，因为它们的所有组分必须完全折叠后才能彼此间正确结合。分子伴侣还可使错误折叠的蛋白质重新折叠，形成天然构象。

很多分子伴侣一开始都被说成**热激蛋白质**(heat shock protein, Hsp)，因为它们的合成速率在温度升高时增大。可能还需要更多的分子伴侣来修复热变性蛋白质，或防止环境压力条件下的错误折叠。原核和真核生物中都存在两类主要的分子伴侣：蛋白质大小为70kDa的**Hsp70**家族和**陪伴蛋白**(chaperonin)，它们都是多亚基的大蛋白。

一个Hsp70蛋白可能在肽链最初30个氨基酸在核糖体上聚合时就和新生肽链结合了。Hsp70可能有助于防止过早折叠。

陪伴蛋白由两类蛋白质组成：

1) **Hsp60蛋白**(*E.coli* 中为 **GroEL**)，由14个相同的约60kDa的亚基组成，排列成两层堆迭的七亚基环，形成 D_7 对称(节6-3)的中空筒。
2) **Hsp10蛋白**(*E.coli* 中为 **GroES**)，由7个相同的约10kDa的亚基组成，以7个折叠旋转(C_7)对称排列形成一圆顶形复合物。

156

Paul Sigler 测定的GroEL-GroES复合物的X射线结构显示，GroEL筒的一个开口端被GroES复合物盖住(图6-40)，与以前电子显微镜研究结果相一致。圆筒内部形成一个保护性环境，蛋白质在其中能够正确折叠，不与其他部分折叠的蛋白质聚集。

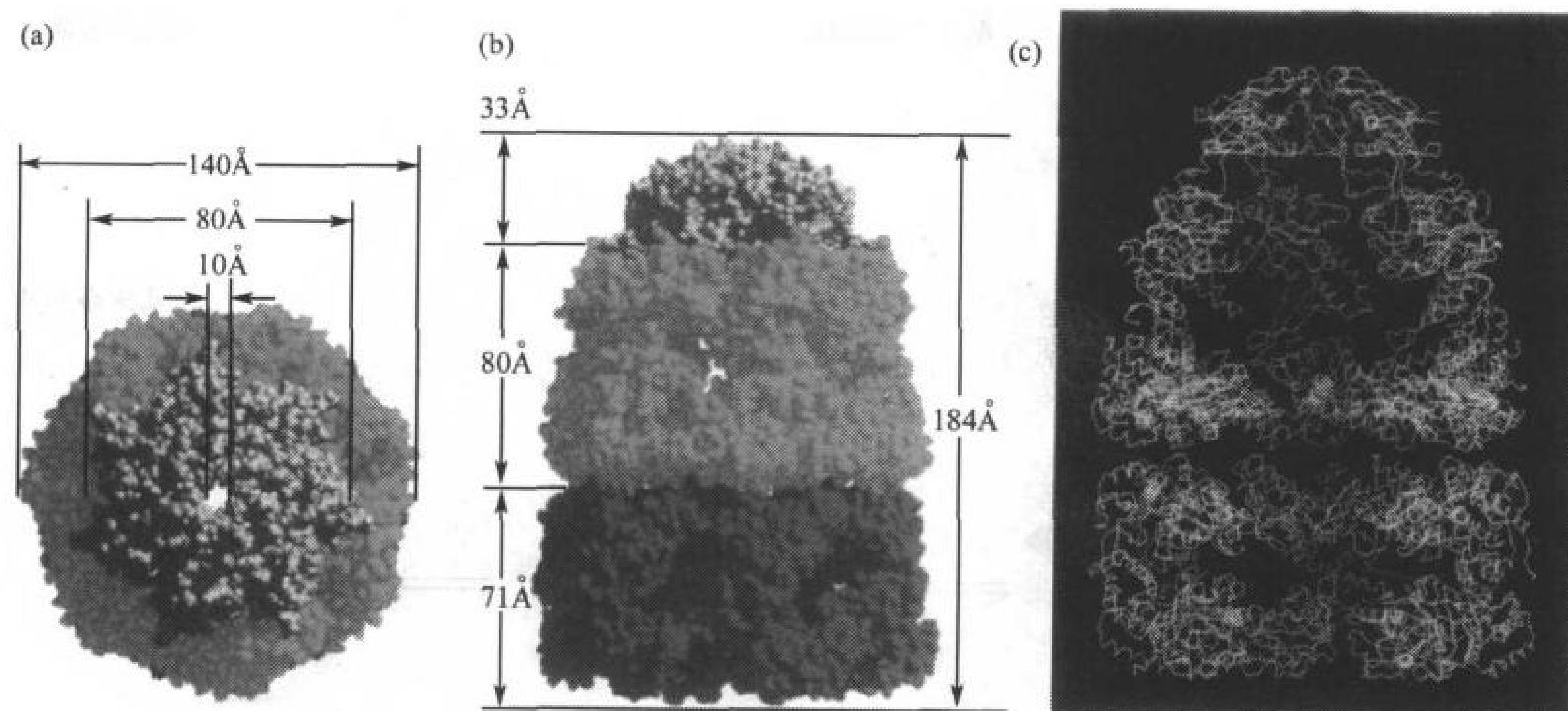


图6-40 GroEL-GroES-$(ADP)_7$ 分子伴侣复合物的X射线结构

GroEL亚基的两个七元环堆叠形成中空筒，其一端被GroES亚基的七元环盖住。(a)沿7个折叠旋转轴俯视的复合物空间填充图，GroES环呈金色，毗连的GroEL环呈绿色，邻近的GroEL环呈红色。(b)同(a)，不同之处是从垂直于7个折叠轴的方向看，注意两个GroEL环的不同构象。(c)从垂直于7个折叠轴看复合物 C_α 骨架，沿轴平面切开。结合在上面GroEL环的各亚基下部的ADP显示为空间充间模型。注意由GroES帽和上面GroEL环形成的大空穴，多肽可在穴中隔离折叠。(引自 Paul Sigler, Yale University)

GroEL 筒内部含有疏水性斑块,它与被筒包住的不正确折叠蛋白质的裸露基团结合,GroEL 亚基结合 ATP 并催化其水解为 ADP 和无机磷(P_i),这一过程驱动构象改变,罩住疏水斑,这样,被缚在疏水斑上的蛋白质就被释放下来继续折叠。这种结合与释放实际上将已部分折叠的蛋白质从那些自由能极小的局部(如图 6-38 所示)释放出来,从而使折叠中的蛋白质沿漏斗形曲线向天然状态下降。在 GroEL-GroES(Hsp60-Hsp10)空筒内的保护性环境中,一个大于 70kDa 的蛋白质得以避免与其他蛋白质接触而正确折叠,否则该蛋白就会与其他蛋白质分子相聚集。

157

这一 ATP 驱动的结合、释放和再折叠循环不断重复,直到蛋白质达到其天然构象。Hsp70 蛋白也被认为是遵循一条类似的结合和 ATP 驱动的折叠蛋白质的释放途径。

D. 蛋白质动力学

蛋白质结构测定的精确性会给人一个错误的印象,即蛋白质具有固定的刚性结构。实际上,**蛋白质是柔性的、快速涨落的分子,其结构运动性具有功能上的重要意义。**从单个侧链到整个结构域或亚基都可能有高达几个 Å 的位移,这种位移是由分子内的随机运动,或响应诸如结合小分子这类触发因素而产生的。伸展侧链如 Lys,以及肽链 N 端、C 端都特别容易在溶液中摆动,因为维持它们不动的力较小。

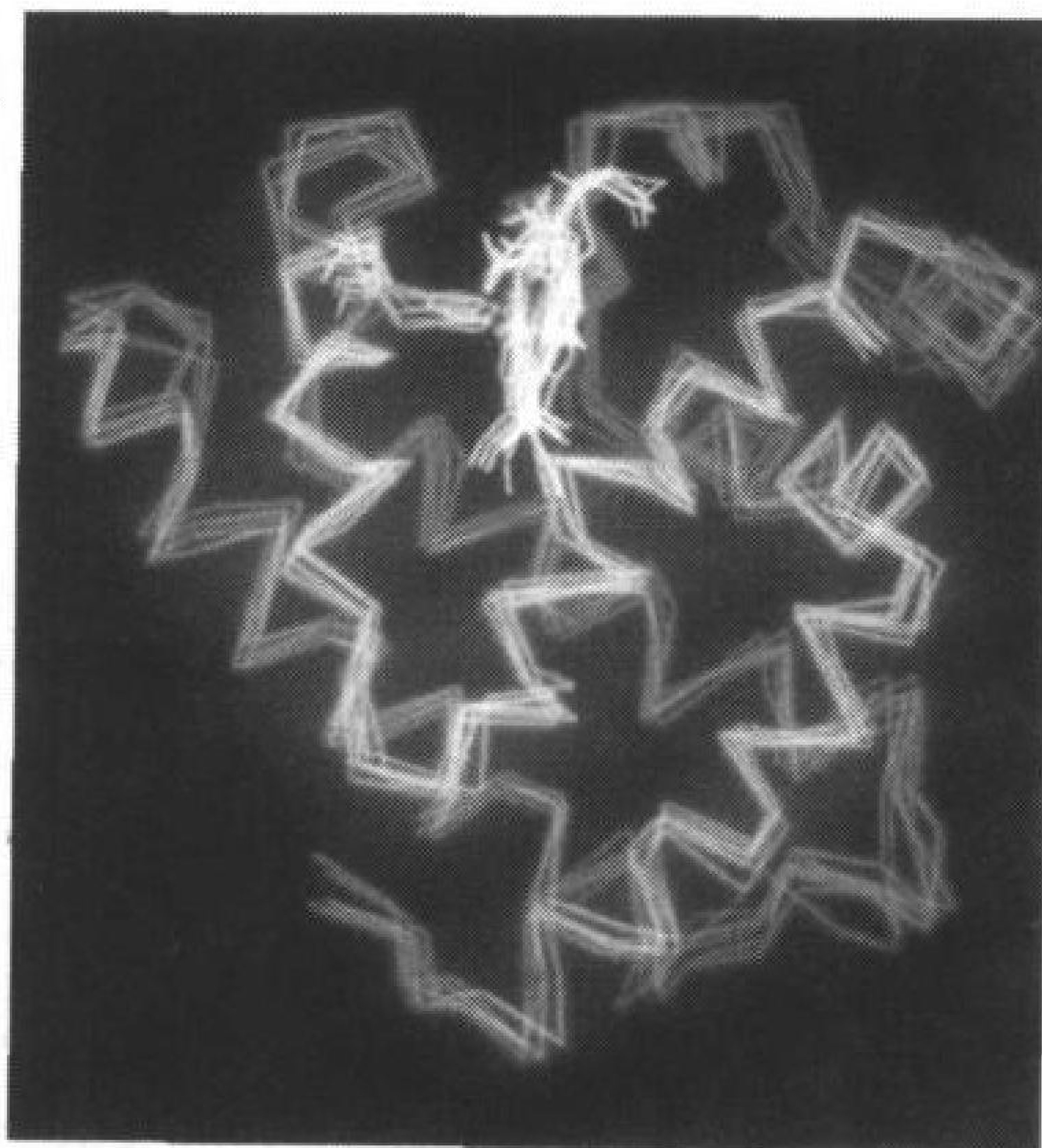


图 6-41　肌红蛋白分子动力学

以间隔 5×10^{-12}s 计算的几个蛋白质“快照”重迭于图中。蓝色为骨架,黄色为血红素,连接血红素与蛋白质的 His 侧链为橙色。(引自 Martin Karplus, Harvard University)

Martin Karplus 的理论计算指出,蛋白质的天然结构可能是由一组具有相同稳定性的构象之间相互快速转变的集合构成的(图 6-41)。高达 2Å 结构位移的构象柔性,又称**间息**(breathing),允许小分子扩散出入蛋白质内部。

小　结

1. 蛋白质的三维形状由结构复杂性的 4 个层次来描述。
2. 肽平面的构象柔性由其 ϕ、ψ 旋转角来描述。
3. α 螺旋是一种规则性二级结构,相距 4 个残基的骨架基团之间形成氢键。在 β 折叠中,不同多肽股的骨架之间形成氢键。
4. 纤维蛋白以特定二级结构为特征:即 α 角蛋白是两个 α 螺旋的左手卷曲缠绕;丝蛋白是一组堆积的 β 折叠阵列;胶原是每三个残基为一圈的左手三螺旋。
5. 非重复结构包括规则性二级结构的衍化、转角和环。
6. 蛋白质的三维结构可由 X 射线晶体学或 NMR 技术测定,三级结构含有基序(超二级结构)和结构域。
7. 球蛋白的非极性侧链倾向于占据蛋白质内部,而极性侧链倾向于在表面上。
8. 蛋白质结构可根据折叠模式归类为家族,结构元件在进化上比氨基酸序列更保守。
9. 多亚基蛋白质的独立单元通常呈对称性排列。
10. 天然蛋白质结构仅比其变性形式稍微稳定一些。疏水效应是蛋白质稳定性的主要决定因素,氢键和离子对

对蛋白质稳定性贡献较小。

11. 蛋白质变性、复性研究表明，蛋白质的一级结构决定其三级结构。

12. 蛋白质沿一定的途径折叠成天然构象，其中，结构小元件聚结成较大的结构。

13. 蛋白质二硫键异构酶和分子伴侣有利于蛋白质体内折叠。

14. 蛋白质具有导致小分子运动的构象柔性。

参考文献

普通

Branden, C. and Tooze, J., *Introduction to Protein Structure,* Garland Publishing (1991).

Chothia, C. and Finkelstein, A.V., The classification and origins of protein folding patterns, *Annu. Rev. Biochem.* **59,** 1007–1039 (1990).

Creighton, T.E., *Proteins* (2nd ed.), Chapters 4–6, Freeman (1993).

Darby, N.J. and Creighton, T.E., *Protein Structure,* IRL Press (1993).

Holm, L. and Sander, C., Mapping the protein universe, *Science* **273,** 595–602 (1996). [Discusses the limited numbers of structural domains.]

Kyte, J., *Structure in Protein Chemistry,* Garland Publishing (1995).

特殊蛋白质

Baldwin, M.A., Cohen, F.E., and Pruisner, S.B., Prion protein isoforms, a convergence of biological and structural investigations, *J. Biol. Chem.* **270,** 19197–19200 (1995).

Bella, J., Eaton, M., Brodsky, B., and Berman, H.M., Crystal and molecular structure of a collagen-like peptide at 1.9 Å resolution, *Science* **266,** 75–81 (1994).

Kaplan, D., Adams, W.W., Farmer, B., and Viney, C., *Silk Polymers,* American Chemical Society (1994).

Prokop, D.J. and Kivirikko, K.I., Collagens: biology, disease, and potentials for therapy, *Annu. Rev. Biochem.* **64,** 403–434 (1995).

技术

Karplus, M. and Petsko, G.A., Molecular dynamics simulations in biology, *Nature* **347,** 631–639 (1990).

Rhodes, G., *Crystallography Made Crystal Clear,* Academic Press (1993).

Wagner, G., Hyberts, S.G., and Havel, T.F., NMR structure determination in solution. A critique and comparison with X-ray crystallography, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21,** 167–198 (1992).

折叠和稳定性

Aurora, R. and Rose, G.D., Helix capping, *Protein Sci.* **7,** 21–38 (1998).

Bardwell, J.C.A. and Beckwith, J., The bonds that tie: catalyzed disulfide bond formation, *Cell* **74,** 769–771 (1993).

Bukau, B. and Horwich, A.L., The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines, *Cell* **92,** 351–356 (1998).

Cordes, M.H.J., Davidson, A.R., and Sauer, R.T., Sequence space, folding and protein design, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6,** 3–10 (1996).

Dahiyat, B. and Mayo, S.L., De novo protein design: Fully automated sequence selection, *Science* **278,** 82–87 (1997).

Dill, K.A. and Chan, H.S., From Levinthal pathways to funnels, *Nature Struct. Biol.* **4,** 10–19 (1997). [A highly readable review of modern theories of protein folding.]

Frydman, J. and Hartl, F.U., Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between in vitro and in vivo mechanisms, *Science* **272,** 1497–1502 (1996).

Honig, B. and Yang, A.-S., Free energy balance in protein folding, *Adv. Prot. Chem.* **46,** 27–58 (1995).

Matthews, B.W., Structural and genetic analysis of protein stability, *Annu. Rev. Biochem.* **62,** 139–160 (1993).

Rost, B. and Sander, C., Bridging the protein-sequence–structure gap by structure predictions, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **25,** 113–136 (1996).

Schwabe, J.W.R. and Klug, A., Zinc mining for protein domains, *Nature Struct. Biol.* **1,** 345–349 (1994).

Stickle, D.F., Presta, L.G., Dill, K.A., and Rose, G.D., Hydrogen bonding in globular proteins, *J. Mol. Biol.* **226,** 1143–1159 (1992).

关 键 词

二级结构	secondary structure	Ramachandran 构象图	Ramachandran diagram
三级结构	tertiary structure	α 螺旋	α helix
四级结构	quaternary structure	螺距	pitch
反式构象	trans conformation	平行 β 折叠	parallel β sheet
顺式构象	cis conformation	反平行 β 折叠	antiparallel β sheet
骨架	backbone	拓扑学	topology
扭转角(二面角)	torsion(dihedral)angle	纤维蛋白	fibrous protein
ϕ		球蛋白	globular protein
ψ		卷曲螺旋	coiled coil

变性	denatured	寡聚物	oligomer
天然	native	启动子	protomer
β凸	β bulge	旋转对称	rotational symmetry
螺旋帽	helix capping	循环对称	cyclic symmetry
转角(β弯折)	reverse turn (β bent)	二面体对称	dihedral symmetry
Ω环	Ω loop	疏水度	hydropathy
X射线晶体学	X-ray crystallography	离子对(盐桥)	ion pair(salt bridge)
NMR	NMR	锌指	zinc finger
衍射图谱	diffraction pattern	复性	renaturation
等高线图	contour map	协同性	cooperativity
超二级结构	supersecondary structure	离液剂	chaotropic agent
βαβ基序	βαβ motif	疏水坍陷	hydrophobic collapse
β发夹	β hairpin	融球	molten globule
αα基序	αα motif	分子伴侣	molecular chaperone
β桶	β barrel	热激蛋白	heat shock protein
二核苷酸结合团	dinucleotide-binding fold	间息	breathing
结构域	domain		

学习思考题

1. 解释为什么肽键的构象自由度是有限的。
2. 规则性二级结构与不规则性二级结构有何差别?
3. 描述α螺旋中的氢键模式。
4. 为什么β折叠呈褶折状?
5. 纤维蛋白给予毛发、角、骨和腱这类物质什么性质?
6. 为什么转角的环最常出现在蛋白质表面?
7. 哪些侧链通常出现在蛋白质内部? 哪些侧链通常出现在蛋白质表面?
8. 说出蛋白质可能的结构数远小于氨基酸序列数的原因。
9. 列出蛋白质具有多亚基的好处。
10. 为什么蛋白质没有镜像对称?
11. 描述稳定蛋白质的作用力。
12. 描述发生在蛋白质折叠过程中的能、熵变化。
13. 蛋白质体外复性与蛋白质体内折叠有何不同。

练 习 题

1. 画出一个顺式肽键并指出有立体位阻的基团。
2. 螺旋可用符号 n_m 来表示,n 为每圈螺旋的残基数,m 为氢键围成的环中所有原子的总数,包括氢原子。(a)对α螺旋如何用 n_m 来表示? (b)3_{10}螺旋比α螺旋陡还是平缓?
3. 计算 100 个残基的α角蛋白卷曲螺旋长多少 Å。
4. 天然蛋白质是否可能完全无规,即完全不含α螺旋、β折叠或其他重复二级结构?
5. (a)Trp 和 Gln 哪个更可能位于蛋白质表面?

(b)Ser 和 Val 哪个不太可能在蛋白质内部?

(c) α 螺旋中部不太可能发现 Leu 还是 Ile?

(d)Cys 和 Ser 哪个更可能存在于 β 折叠中?

6. 将 3-磷酸甘油醛脱氢酶(图 6-30)描绘成一个从 N 端开始的 α 螺旋("α")和 β 折叠股("β")的线性序列。N 端区域为红色。
7. 对于含(a)4 个、(b)6 个相同亚基的蛋白质,分别可能是哪种旋转对称?
8. 如果时间足够长,是否所有变性蛋白质都能自发复性?
9. 描述加热胶原产生明胶时,断裂或保持的分子内及分子间的键或相互作用。
10. 在生理条件下,多聚赖氨酸呈无规卷曲构象,在何种条件下会形成 α 螺旋?
11. 通常认为蛋白质与它们所结合的分子相比是相当大的,但这决定于你的观点。分别计算一个血红蛋白分子(65kDa)和它结合的 4 个 O_2 分子的体积比,和普通办公室(4m×4m×3m)与一个普通职员(70kg)的体积比。假设血红蛋白和 O_2 分子体积与其相对分子质量等比例,职员的密度为 $1.0g/cm^3$。比较这两个比率,是你所期望的结果吗?
12. 下列多肽中哪个最可能形成 α 螺旋? 哪个最不可能形成 β 折叠股?

(a)CRAGNRKIVLETY

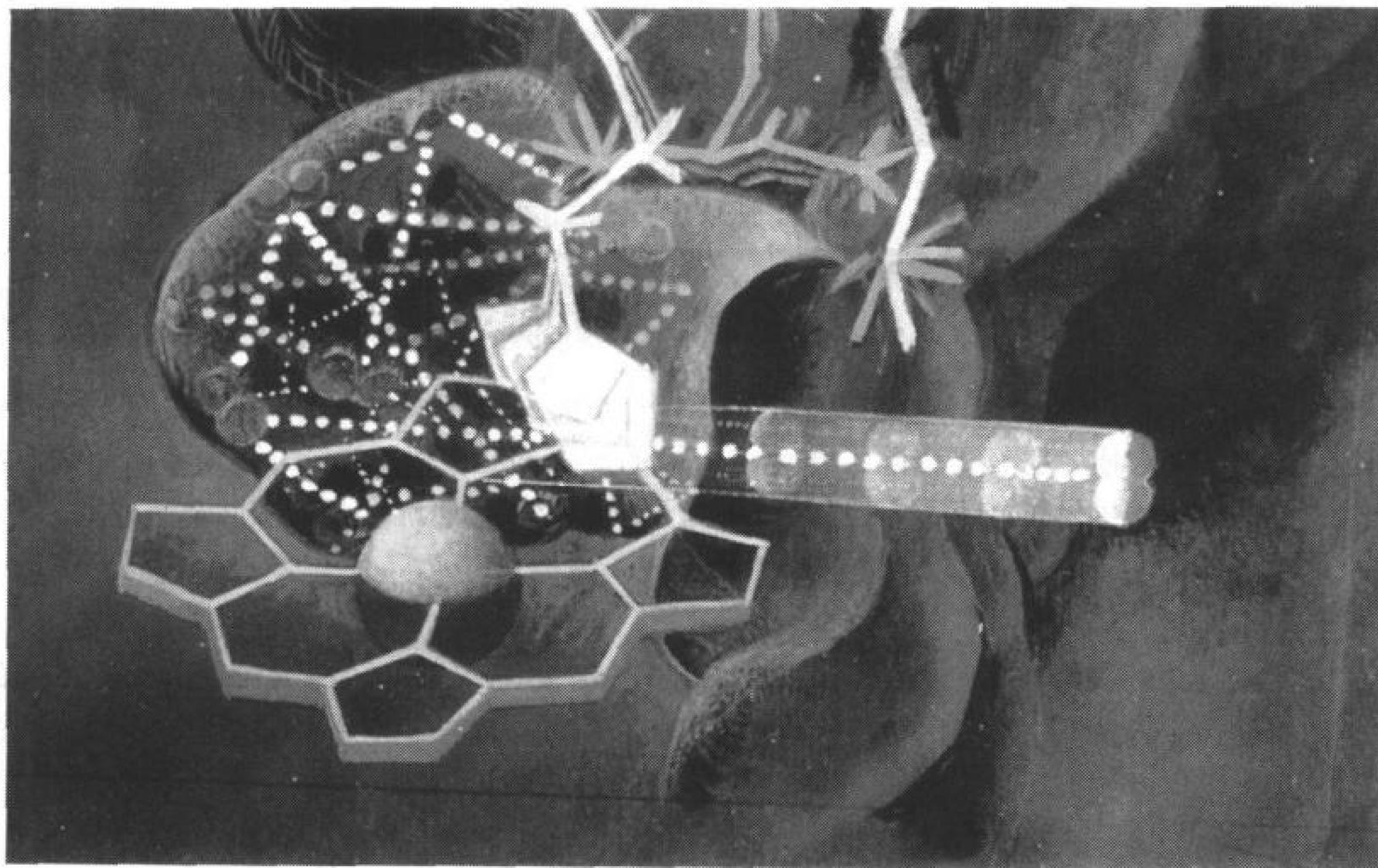
(b)SEDNFGAPKSILW

(c)QKASVEMAVRNSG

(以上题目由 Bruce Wightman, Muhlenberg College 提供)

(南京大学 王 进 译)

第 7 章　蛋白质功能



蛋白质无论与一个小分子结合或者与另外的大分子相互作用，它的结构决定了它的生物功能。例如肌红蛋白氧结合部位的结构使得氧能很容易地与它结合或者从整个蛋白上脱落(见上图)。(引自 Irving Geis)

162

前两章粗略地描述了蛋白质的化学和物理特性，但还没有深入地探究它们的生理功能。蛋白质结构的复杂性和多样性使它们能完成多种生理功能。例如，几乎所有催化重要代谢反应的酶都是蛋白质(酶将在第 11 章和第 12 章详细地讨论)。如果不是蛋白质参与转录和翻译遗传信息，遗传信息还只能留在 DNA 中。值得一提的是，成千上万的参与构建、支撑、识别、转运和转

化细胞组分的蛋白质以令人难以置信的速度和精度行使功能，而且在多数情况下，它们受多种调节机制的调控。

从节 6-1C 中的纤维蛋白到后几章中讨论的受到精确调节的代谢中的酶，我们将以蛋白质怎样与生命体系中的其他组分结合和相互作用的方式来理解它们的特殊功能。我们将研究与小分子结合的蛋白质、与其他蛋白相互作用的蛋白质及与大分子如核酸结合的蛋白质。在这一章中，我们将集中讨论众多蛋白类别中研究得较为清楚的 4 种蛋白质，它们分别是肌红蛋白、血红蛋白、肌球蛋白和肌动蛋白及抗体。研究这 4 种蛋白质已经成为生物化学某些方面前进的主要源泉；它们相应的功能对人类健康非常重要；它们的模型对许多蛋白都非常有用。这些蛋白也将是我们在以后讨论代谢及遗传信息的调控时研究的蛋白。

1. 肌红蛋白

我们以**肌红蛋白**(myoglobin)为例开始蛋白质功能的研究。肌红蛋白是第一个用 X 射线晶体分析法测定结构的蛋白质。肌红蛋白除了作为结合氧的蛋白的重要性外，它的结构和功能为洞察血红蛋白的结构和功能提供了很大的帮助，血红蛋白是一个由类似肌红蛋白的多肽链组成的四聚体。

A. 肌红蛋白的结构

肌红蛋白是脊椎动物肌肉中的一个小的胞内蛋白。John Kendrew 于 1959 年测定了它的 X 射线晶体结构，揭示了肌红蛋白的 153 个氨基酸残基中的大多数处于 8 个 α 螺旋中(习惯上命名为 A～H)，呈球状，尺寸约为 44Å×44Å×25Å(见图 7-1)。

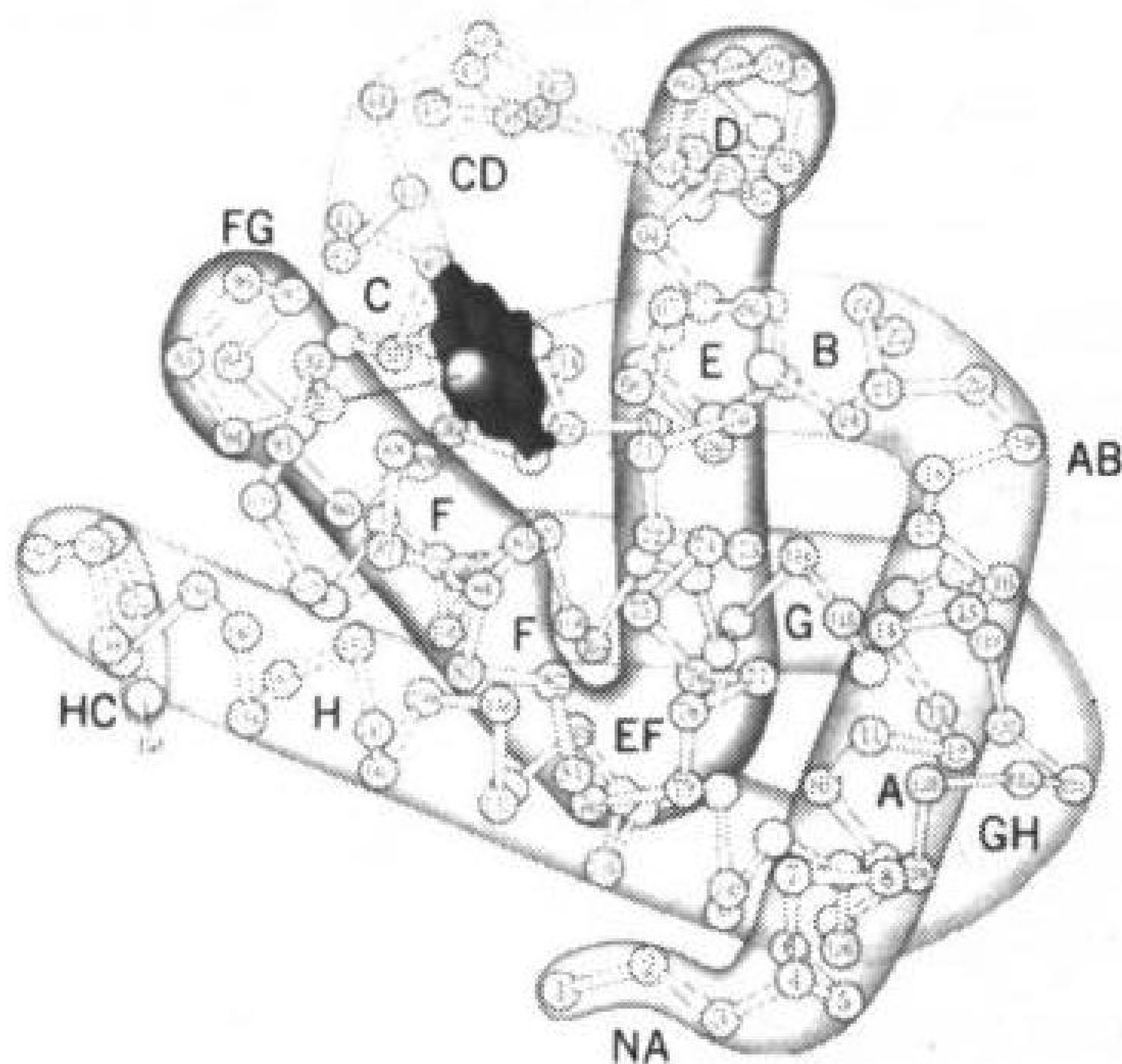


图 7-1 抹香鲸肌红蛋白结构

这个含有 153 个氨基酸残基的单体蛋白由 8 个 α 螺旋组成(从 A 命名到 H)，它们之间由短的多肽链连接(原先认为是 EF 转角的后半部分已经被证实也形成了一个短的 α 螺旋，命名为 F′螺旋)。(引自 Irving Geis)

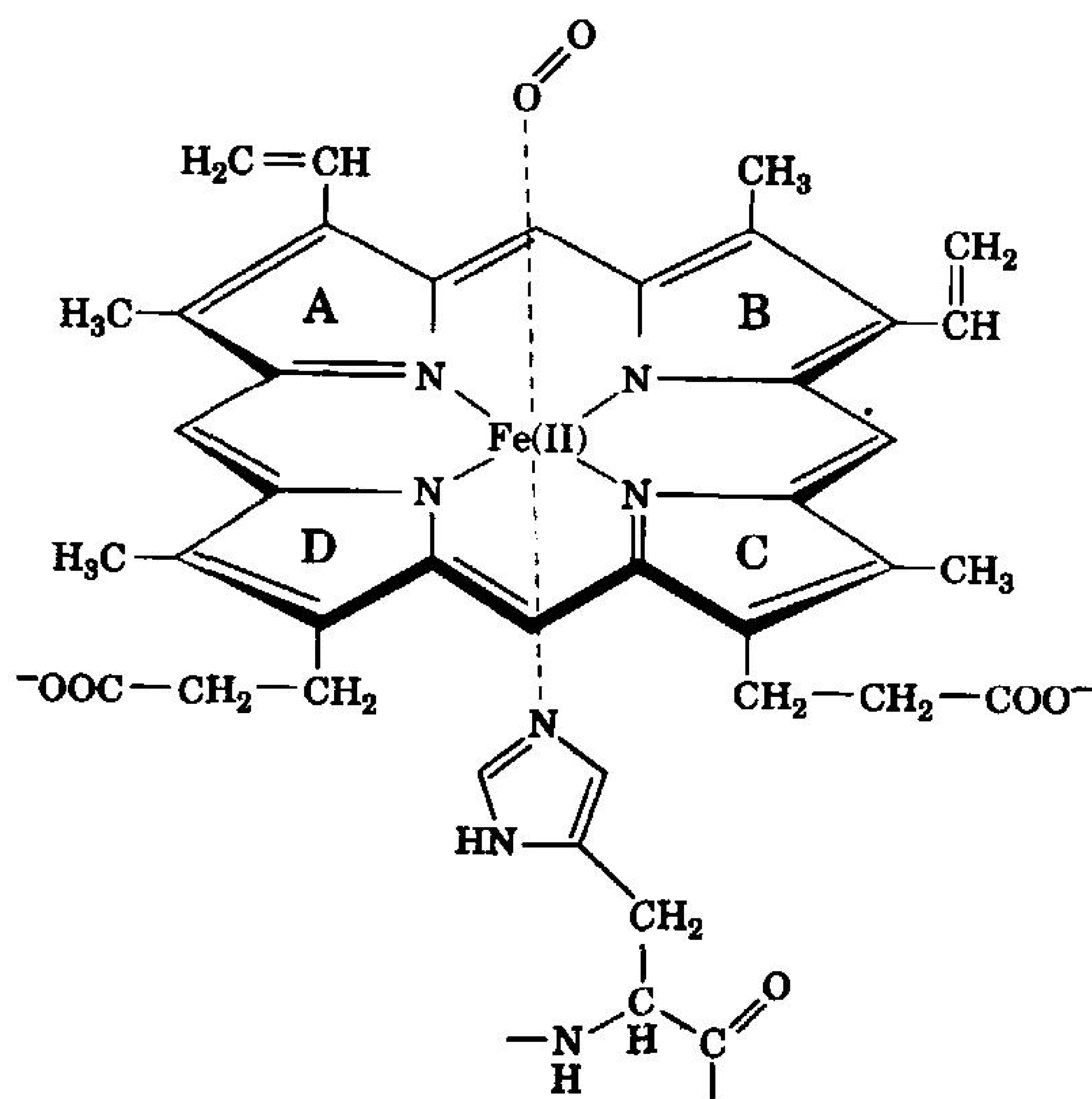


图 7-2 血红素辅基

中心的 Fe(II)原子与卟啉环的 4 个 N 原子相连，卟啉环的吡咯基标记为 A～D。血红素是一个共轭系统，所有 Fe—N 键是等价的。Fe(II)也经常与 His 的侧链相连，当有 O_2 存在时，也与 O_2 结合。

肌红蛋白、球蛋白家族的其他成员和其他一些蛋白质如细胞色素 c（见节 5-4 和节 6-2C）都含有单个的**血红素**（heme）辅基（见图 7-2）。血红素处于肌红蛋白的 E、F 螺旋的疏水口袋中。血红素的杂环是**卟啉**（porphyrin）衍生物，含有 4 个**吡咯**（pyrrole）环（标记为 A～D），通过亚甲基桥联在一起（其他蛋白的卟啉在 A～D 环中有一些替代）。血红素中心的 Fe(II)原子和一个 His（叫 His F8，因为它是 F 螺旋的第 8 个残基）侧链的 N 原子结合。氧作为 Fe 原子的第 6 个配基。His E7（E 螺旋的第 7 个残基）与 O_2 间以氢键结合，其几何图形见图 7-3。在血红素的 O_2 结合位点上，两个疏水侧链 Val E11 和 Phe CD1（螺旋 C 和 D 之间片段的第一个残基）帮助血红素保持在相应的位置上。当血红蛋白"呼吸"时（见节 6-4D），这些侧链可以摆动开，允许 O_2 进入和保持在相应位置。

163

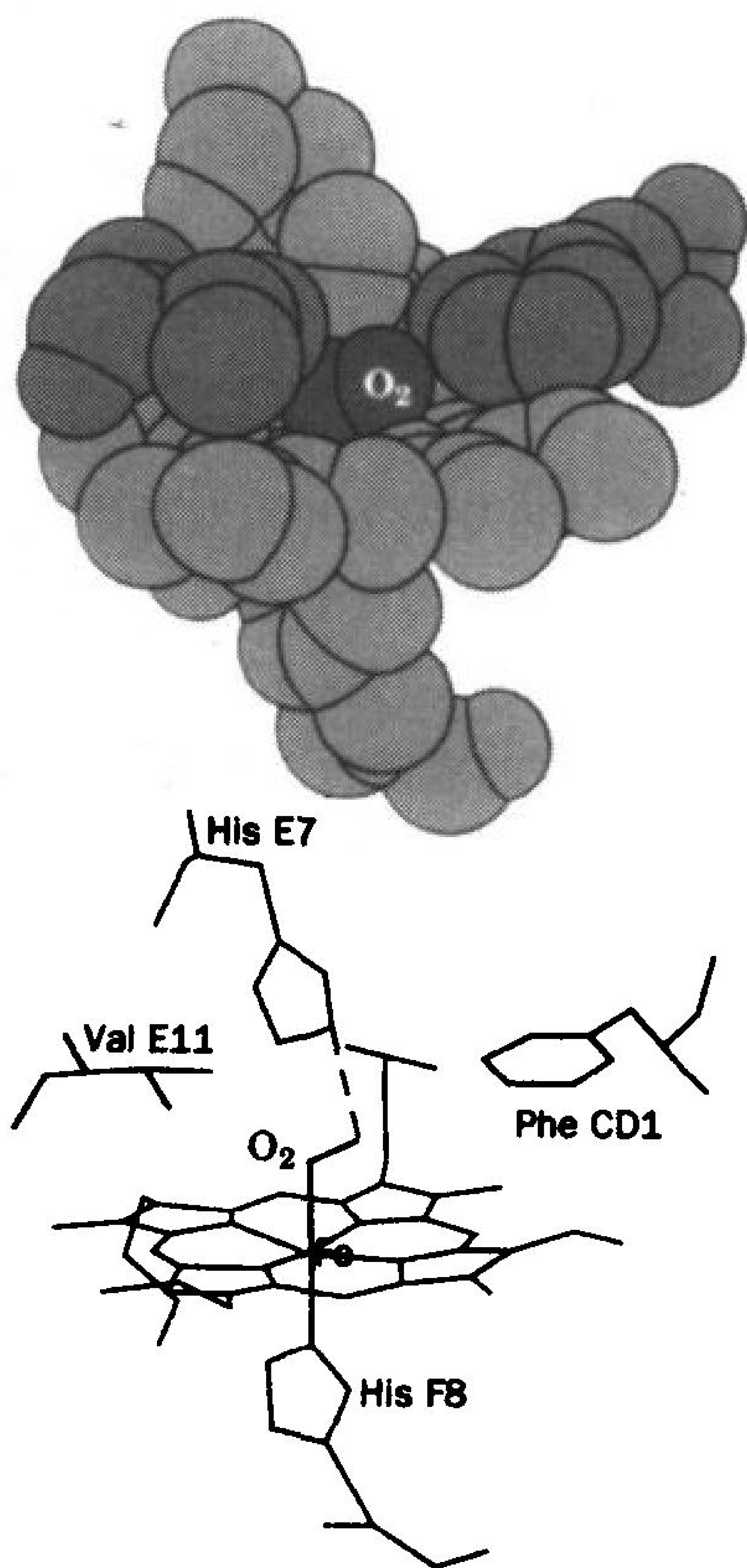


图 7-3　肌红蛋白中的血红素复合物
图上方为原子用填实的球表示（未画出氢原子）。下方是用虚线表示 His E7 和结合的 O_2 之间氢键的相应的骨架模型。

当暴露在氧气中后，从血红素中分离到的亚铁离子不可逆地转变为三价铁离子，从而失去结合 O_2 的能力。肌红蛋白的蛋白部分阻止这种氧化，能使 O_2 与血红素基团可逆结合。**氧合**（oxygenation）改变了 Fe(II)-血红素复合物的带电状态，使其颜色从暗红色（静脉血中血红素的颜色）变为亮红色（动脉血中血红素的颜色）。在一些条件下，肌红蛋白和血红蛋白中的 Fe(II)被氧化成了 Fe(III)，形成**高铁肌红蛋白**（metmyoglobin）或**高铁血红蛋白**（methemoglobin），这就是搁置一段时间的肉或干血呈现棕色的原因。

除了 O_2 外，CO、NO 和 H_2S 也能与血红素结合，它们的亲和力都比 O_2 高，所以具有毒性。例如，CO 对血红蛋白的亲和力比 O_2 高 200 倍。

B. 肌红蛋白的功能

虽然肌红蛋白一开始被认为是贮存氧气的蛋白质，但是现在认为它的主要功能是有利于氧气转移到肌肉（在高强度运动情况下呼吸最快的组织）。O_2 从毛细血管向组织中扩散受其溶解度低的限制（氧在血中的溶解度约为 $10^{-4}mol\cdot L^{-1}$）。作为一种分子 bucket brigade，肌红蛋白增加了氧气的扩散速率，从而增加了 O_2 在肌肉中的溶解度。肌红蛋白的贮氧功能大概只在像海豹和鲸之类的哺乳动物中才有意义，在这些动物的肌肉中肌红蛋白的含量是陆生哺乳动物的 10 倍（这是 Kendrew 选择抹香鲸作为肌红蛋白的来源进行 X 射线晶体衍射研究的原因之一）。

164

O_2 和**肌红蛋白**（Mb）的可逆结合可以用一个简单的等式描述：



$$Mb + O_2 \rightleftharpoons MbO_2$$

反应的解离常数 K 为

$$K = [Mb][O_2]/[MbO_2] \qquad [7\text{-}1]$$

注意生物化学中常用解离常数表示平衡，而化学家喜欢用解离常数的倒数来表示平衡。肌红蛋

白的 O_2 解离情况可以用它的**饱和系数**(fractional saturation) Y_{O_2}来表示,它的定义是氧结合部位结合氧的分数。

$$Y_{O_2} = [MbO_2]/\{[Mb] + [MbO_2]\} = [O_2]/\{K + [O_2]\} \quad [7\text{-}2]$$

既然 O_2 是气体,它的浓度可以由**分压**(partial pressure) pO_2 表示(也叫氧压力浓度),式 7-2 可以表示为

$$Y_{O_2} = pO_2/[K + (pO_2)] \quad [7\text{-}3]$$

上述等式描述了一个矩形**双曲线**(hyperbola),在形式上与激素和细胞表面受体结合以及小分子底物与酶活性中心的结合是一样的。这种双曲线功能如图 7-4 所示。在 pO_2 较低时,只有很少的氧与肌红蛋白结合(Y_{O_2}很小)。当 pO_2 增加时,更多的氧与肌红蛋白结合。在很高的 pO_2 时,几乎所有的氧结合部位都被占据,这样肌红蛋白就被 O_2 **饱和**(saturate)了。

对一简单的结合来讲(如 O_2 与肌红蛋白的结合),双曲线的陡峭程度随 K 值的增加而增加。当 $pO_2 = K$ 时,肌红蛋白达到半饱和。这时可以用 K 代替式 7-3 中的 pO_2。这样 K 可以认为是 $Y = 0.5$ 时的 pO_2(图 7-4)。

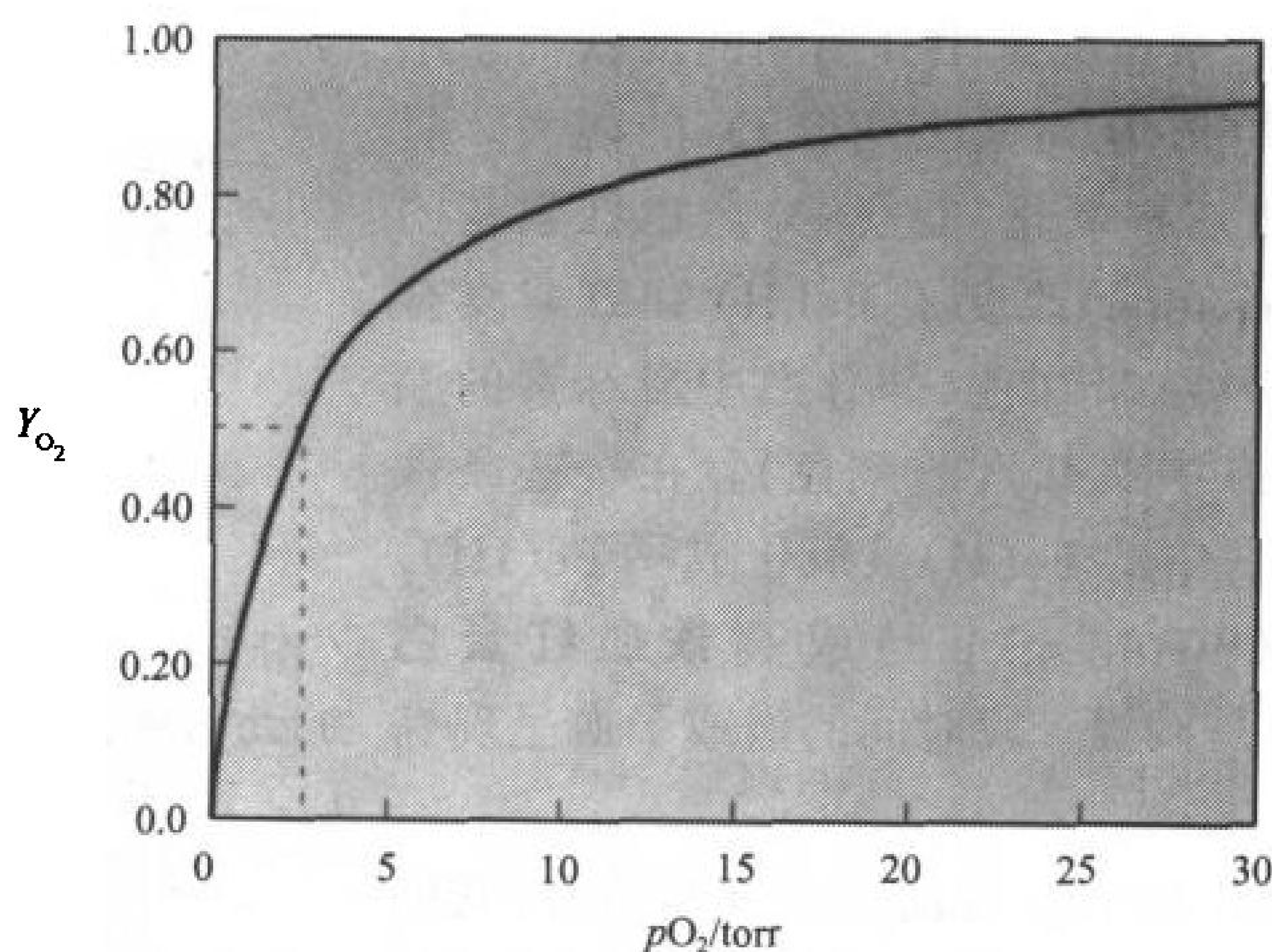


图 7-4 肌红蛋白的氧合曲线

肌红蛋白在氧分压(pO_2)为 2.8 torr 时被 O_2 半饱和($Y_{O_2} = 0.5$)。肌红蛋白的双曲线形结合曲线是小分子和蛋白质简单结合的典型曲线。

把 K 定义为P_{50}(肌红蛋白达到半饱和时的氧分压)有很多方便。肌红蛋白的 p_{50}为 2.8 torr (760torr = 1atm),血中的 pO_2 在生理范围内(动脉血中为 100torr,静脉血中为 30torr),肌红蛋白几乎被完全饱和。例如,在 $pO_2 = 100$torr 时,$Y_{O_2} = 0.97$;而在 $pO_2 = 30$torr 时,$Y_{O_2} = 0.91$,因此肌红蛋白能有效地将氧气从毛细血管转移到肌肉细胞。

肌红蛋白只含有一条多肽链、一个血红素辅基及一个 O_2 结合部位,对于其他结合蛋白来讲它是一个有用的模型。甚至对于含有多个同样的小分子或**配基**(ligand)结合部位的蛋白质来讲,在配基和每一结合部位独立作用时都产生双曲线形的结合曲线。实际上,配基和结合它的蛋白间的亲和力并不知道,建立如图 7-4 的结合曲线或许可以提供这种信息。

2. 血红蛋白

165

血红蛋白(hemoglobin)是使红细胞变红的胞内蛋白，它是研究得最彻底的蛋白质之一，也是最早与特异生理功能(传递氧)联系在一起的蛋白质之一。然而，血红蛋白不仅是一个简单的氧气储罐，它是一个在各种环境下为组织提供适量氧的传递系统。太大的动物(>1mm 厚)不能通过简单的扩散把足够的氧气传递到组织中，它们具备含有血红蛋白或其他类似功能蛋白(见框7-1)的循环系统来完成这一功能。

框 7-1 生物化学相关内容

其他的氧转运蛋白质

地球大气中氧气的存在和在代谢燃料燃烧中的利用推动了贮氧和转运氧的多种机制的进化。小生物体依靠扩散来满足呼吸氧气的需要。然而，由于物质的扩散速率随着扩散距离的平方变化巨大，大于 1mm 的生物用循环系统突破了这一限制，用特异的氧传递蛋白突破了 O_2 在水中溶解度小的限制。

在许多脊椎动物中甚至在一些植物和细菌中，都含有以血红素为基础的 O_2 结合蛋白，单亚基或多亚基血红蛋白既可以作为血液和其他体液中的胞内蛋白，也可以作为胞外蛋白。细菌中的类血红蛋白的零星出现增加了进化过程中基因在一点或多点从动物向细菌传递的可能性。在一些豆科植物中，所谓的豆血红蛋白把氧气转运到寄生在根部的固氮菌中。在一些环节动物(例如蚯蚓)中的血绿蛋白含有一个与血红蛋白中略为不同的卟啉衍生物，解释了血绿蛋白中的绿色血颜色。

在无脊椎动物中有另两种 O_2 结合蛋白，血蓝蛋白和蚯蚓血红蛋白(都不含血红素辅基)。血蓝蛋白含有约 75kDa 的亚基，每一亚基有两个 Cu 原子与 His 残基相连，当氧合时为蓝色，而无氧时为无色。蚯蚓血红蛋白(亚基分子质量约 13kDa)的两个 Fe 原子与 His 和酸性残基结合，氧合时为紫色(脱氧时为无色)。蚯蚓血红蛋白多数在胞内，而血蓝蛋白多数在胞外，一些无脊椎动物的肌肉中含肌红蛋白，血中含血绿蛋白或血蓝蛋白。

通常，多数胞外氧转运分子为大的多聚蛋白，相对分子质量多达几百万道尔顿，氧结合部位超过100。这些蛋白多数在胞外蛋白中占主导地位。它们还有其他的功能，如作为缓冲体系对抗 pH 的变化和渗透压的波动等。在一些无脊椎动物中，氧结合蛋白还可作为变形或蜕皮过程中的营养储备物。

血红蛋白结合和释放 O_2 的效率使我们回想起代谢酶的特异性和效率。因为许多用来解释 O_2 与血红蛋白结合的理论也可用来解释酶活性的调控，血红蛋白被称为“英雄酶”。这一节包括血红蛋白的结构、氧气结合的协同效应和血红蛋白缺陷疾病。

A. 血红蛋白的结构

如图 6-32 所示，哺乳动物的血红蛋白是一个四聚体蛋白质，四级结构为 $\alpha_2\beta_2$(是 $\alpha\beta$ 二聚体的二聚体)。α、β 亚基在结构和进化关系上彼此相关，而且和肌红蛋白相关(球状多肽的系统在节 5-4B 中讨论)。

166

血红蛋白的结构由蛋白质 X 射线晶体衍射之父 Max Perutz 测定，他用顽强的毅力和乐观精神工作了近 30 年，终于在 1968 年获得了高分辨率的马血红蛋白的 X 射线晶体结构，在血红蛋白的 α 和 β 亚基中，只有 18% 的残基与肌红蛋白的相同，但是 3 种多肽的三级结构极为相似(血

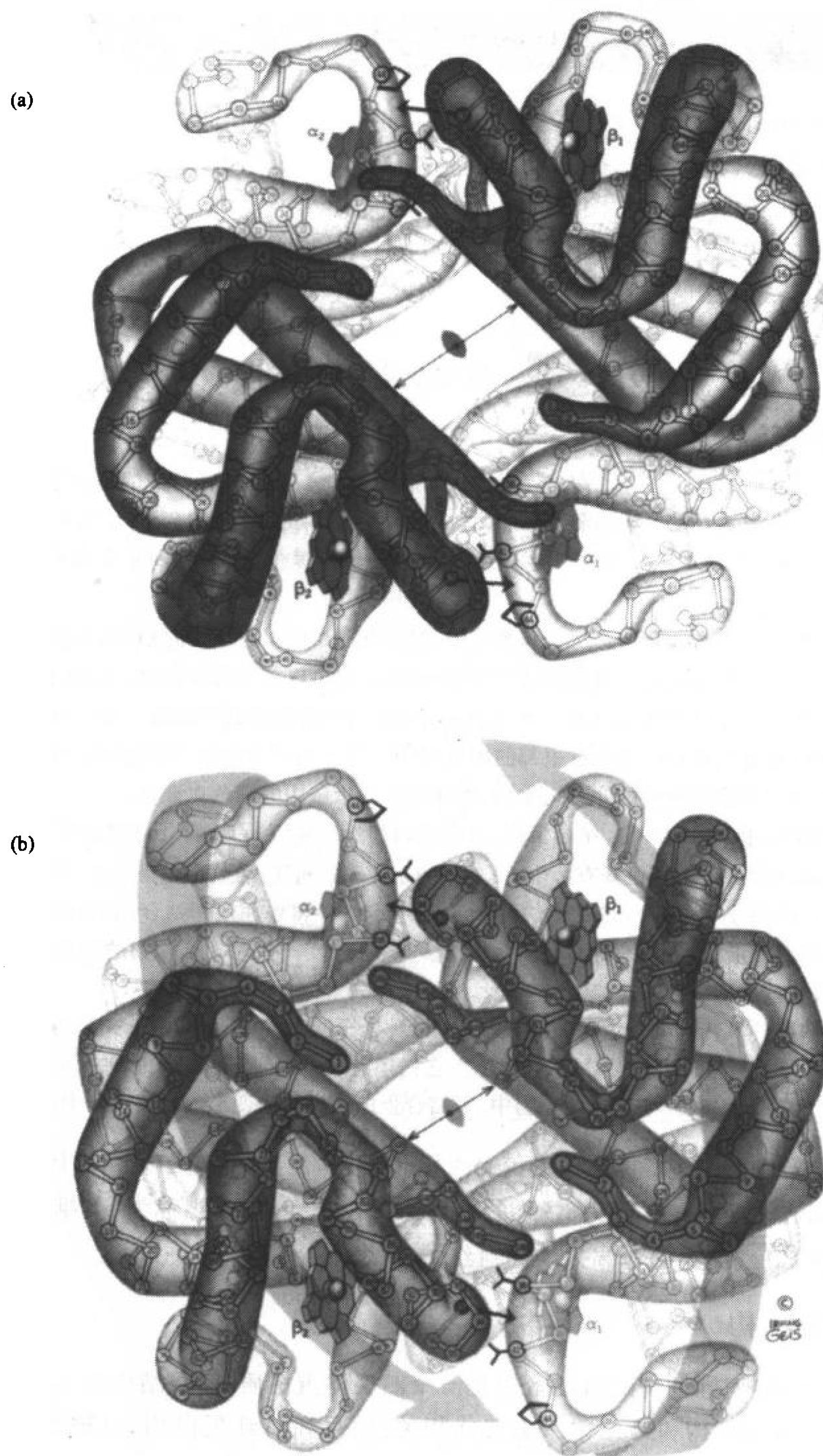


图 7-5 血红蛋白结构

(a)脱氧血红蛋白和(b)氧合血红蛋白。$\alpha_1\beta_1$ 二聚体和 $\alpha_2\beta_2$ 二聚体的关系是二重轴对称的关系(透镜特征),对称轴垂直于纸面。氧合使得 β 链相互靠近(比较图中两个双箭头的长度),并使位于 α_1-β_2 和 α_2-β_1 界面上(一些有关的侧链用黑色表示)的亚基间的接触发生了移动。在(b)中大的灰色的箭头表示伴随氧合而发生的分子运动。(引自 Irving Geis)

红蛋白亚基用肌红蛋白的 α 螺旋标记系统命名,但是 α 链没有 D 螺旋)。血红蛋白的 αβ 二聚体是二重旋转对称(即 180 度的旋转使得二聚体重合)关系。此外,血红蛋白结构类似的 α 和 β 亚基是近似的二重旋转关系(假对称),它的对称轴与确切的二重旋转轴垂直。因此,血红蛋白含有真正的 C_2 对称和假 D_2 对称(见节 6-3,具有 D_2 对称的物体有四面体的旋转对称)。血红蛋白分子的总二维尺寸为 64Å×55Å×50Å。

氧气的结合改变了整个血红蛋白四聚体的结构,所以**脱氧血红蛋白**(deoxyhemoglobin)(图 7-5a)和**氧合血红蛋白**(oxyhemoglobin)(图 7-5b)的结构明显不同。血红蛋白的两种形式中,α 和 β 亚基间形成了广泛的接触:在 α_1-β_1 亚基界面上(及 α_2-β_2 界面上)有 35 个残基,在 α_1-β_2 界面(及 α_2-β_1 界面)上有 19 个残基。这些结合多数为疏水性的,也有一些氢键和离子键参与。注意,α_1-α_2和 β_1-β_2 的相互作用是很弱的,因为这些亚基配对被一个 20Å 直径的装满溶剂的通道分开了,该通道与 50Å 长的血红蛋白的确切的二重轴平行(图 7-5)。

当氧结合时,α_1-β_2(和 α_2-β_1)接触移动,使四级结构发生变化。氧合使 α β 二聚体相对于另一

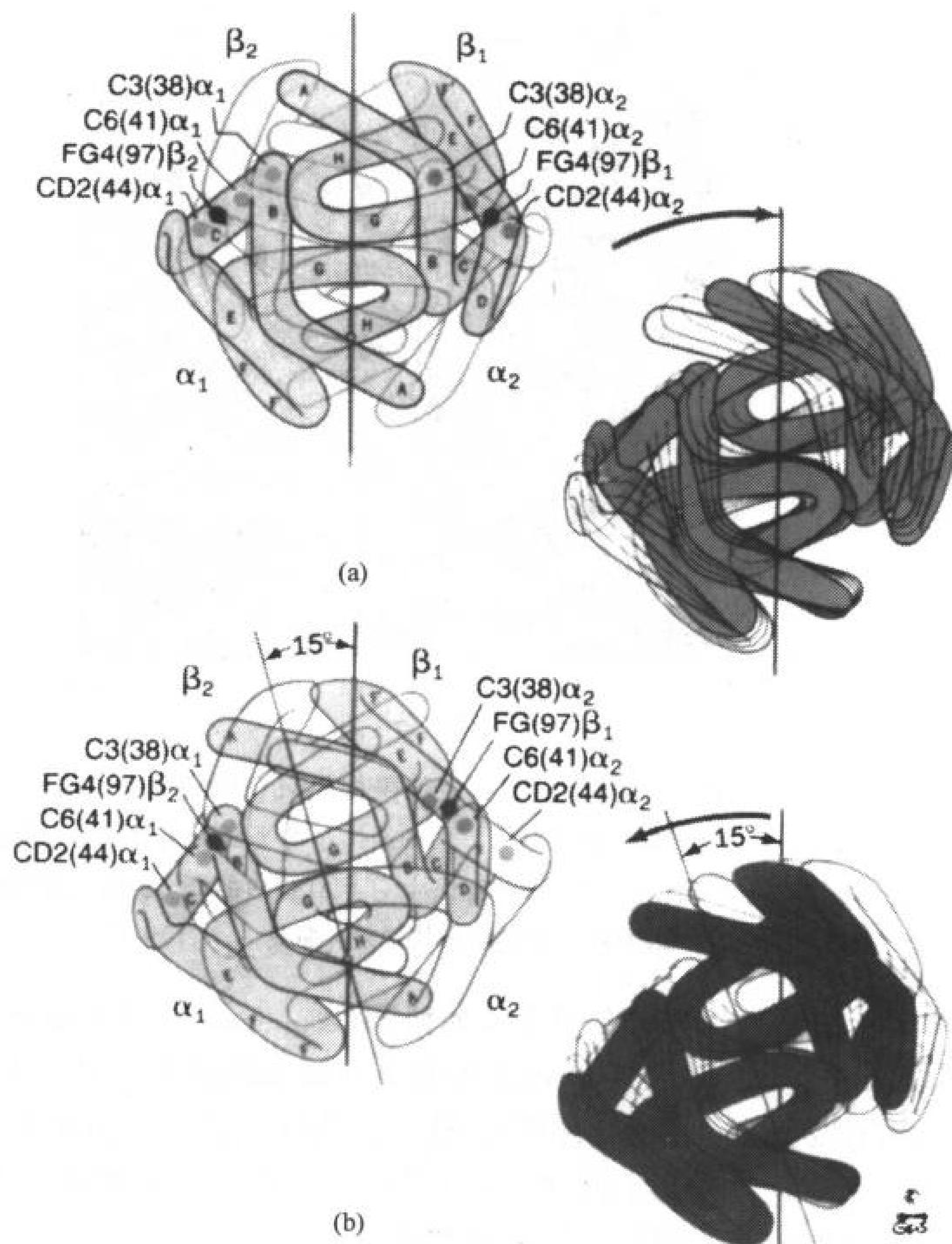


图 7-6 脱氧血红蛋白(a)和氧合血红蛋白(b)四级结构构象上的主要差别

如图所示那样,在氧合时,$\alpha_1\beta_1$(阴影)和 $\alpha_2\beta_2$(轮廓线)二聚体移动,以至于一个二聚体相对于另一个维持确切的二重旋转的二聚体偏离中心旋转了大约 15°。注意在 α_1-β_2 和 α_2-β_1 界面上 His FG4β(五角形)的位置相对于 Thr C3α、Thr C6α 和 Pro CD2α(黄点)发生了怎样的变化。此图是图 7-5 的右视图。(引自 Irving Geis)

个 αβ 二聚体旋转了 15°(图 7-6),导致了 β 亚基靠在一起和使血红蛋白的充满溶剂的中央通道变窄(图 7-5)。α_1-β_1 及 α_2-β_2 界面上的某些原子移动了 6Å 之多(氧合导致了这样大的四级结构变化以至于脱氧血红蛋白的晶体在暴露于 O_2 时就散开了)这种结构重组是血红蛋白结合氧过程中的关键一步。

B. 氧与血红蛋白的结合

血红蛋白的 p_{50} 为 26torr(即血红蛋白在氧分压为 26 torr 时半饱和),几乎比肌红蛋白的 p_{50} 高 10 倍。而且血红蛋白并不表现出像肌红蛋白那样的双曲线型氧合曲线。相反,血红蛋白与氧的结合是用 S 型曲线描述的(图 7-7)。*在同样的 p_{50} 下,S 型曲线比双曲线能够使血液运送更多的氧气到组织中去*(图 7-7,虚线表示双曲线型的血红蛋白)。例如,血红蛋白在动脉氧分压(在 100torr 时 $Y_{O_2}=0.95$)下几乎被 O_2 完全饱和,但在静脉氧分压(在 30torr 时, $Y_{O_2}=0.55$)时仅半饱和。这氧饱和中 0.4 的差别是血红蛋白把氧气从肺运送到组织的能力的测量,如果血红蛋白表现出双曲线的结合行为时这个差别只有 0.25。

168

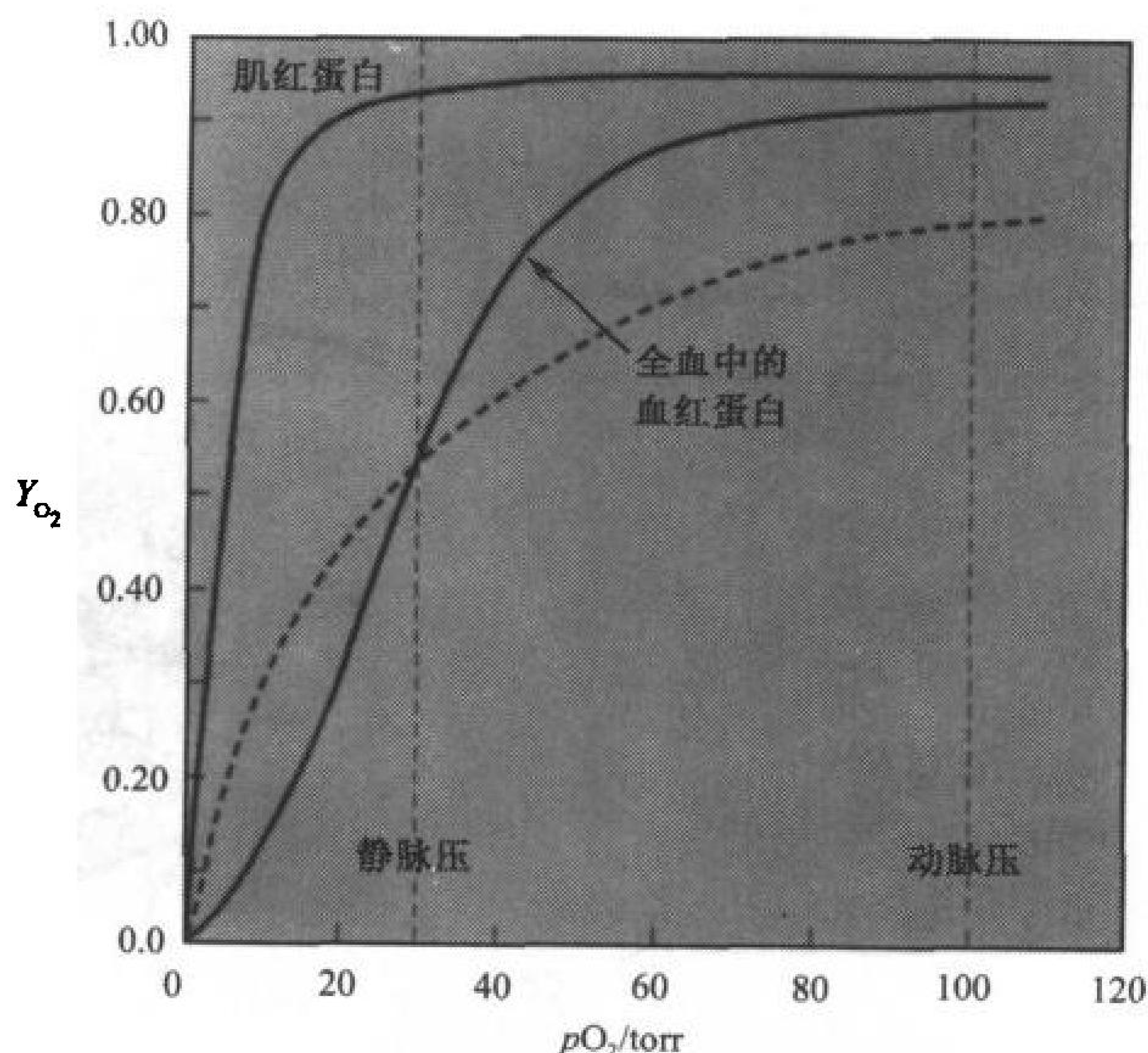


图 7-7 *功能的秘诀*:血红蛋白的氧合曲线

在全血中,血红蛋白在氧分压为 26torr 时达到半饱和。图中给出了海平面上人的正常动脉血和静脉血 pO_2(在海平面上大气的 pO_2 为 150~160torr)。为了比较也给出了肌红蛋白的氧合曲线。虚线代表为血红蛋白在同样 p_{50} 下的双曲线型氧合曲线。

*在任何结合系统中,S 型曲线是结合部位之间***协同***(cooperative)作用的特征*。这意味着一个配体与一个结合部位结合会影响其他配体与另外的结合部位的结合。对于血红蛋白来讲,O_2 与一个亚基的结合增加 O_2 与其余亚基的亲和性。氧合曲线的起始部分斜率低(图 7-7),因为血红蛋白亚基独立地与第一个 O_2 竞争。然而,O_2 分子与血红蛋白一个亚基的结合增加了 O_2 对其他亚基的亲和性,这就是 S 型曲线中间部分斜率增加的原因。

Hill 方程描述血红蛋白的氧合曲线

最早由 Archibold Hill 在 1901 年试图用公式分析血红蛋白的 S 型氧解离曲线。Hill 假设血

红蛋白(Hb)在一步反应中结合了 n 个 O_2 分子。



$$Hb + nO_2 \rightarrow Hb(O_2)_n$$

即,无限大的协同性。这样,与式 7-3 相似推出

$$Y_{O_2} = (pO_2)^n / [(p_{50})^n + (pO_2)^n] \qquad [7\text{-}4]$$

该方程被称为 **Hill 方程**。此方程描述了血红蛋白作为 pO_2 功能的饱和度。

Hill 假定的无限大的 O_2 结合协同性,在物理上是不可能的。然而 n 可以认为是与相互作用的血红蛋白亚基内的协同性程度有关而不是与在一步反应中结合 O_2 的亚基数有关的非整数参数。Hill 方程能用来作为有用的经验曲线-拟合关系而不是配体结合的特定模型的标志。

n 值,即 **Hill 常数**(Hill constant),*随反应的协同性程度而增加,这样提供了一个便利的配体结合反应的简单的特征*。如果 $n = 1$,方程 7-4 可像描述肌红蛋白曲线的方程 7-3 那样描述双曲线,氧结合反应是**非协同的**(noncooperative)。如果 $n > 1$,描述的反应为**正协同的**(positively cooperative),因为 O_2 结合增加了血红蛋白进一步结合 O_2 的亲和性(当血红蛋白中的 O_2 结合部位 $n = 4$ 时,协同性无穷大)。相反,如果 $n < 1$,反应为**负协同的**(negatively cooperative),因为 O_2 结合将减弱血红蛋白与其余 O_2 的结合。

Hill 常数 n 和最能描述血红蛋白饱和曲线的 p_{50} 的值可以通过像下面那样的变换式 7-4 画图确定。

$$Y_{O_2} / (1 - Y_{O_2}) = (pO_2)^n / (p_{50})^n \qquad [7\text{-}5]$$

两边取对数得直线方程

169

$$\lg Y_{O_2} / (1 - Y_{O_2}) = n \lg pO_2 - n \lg p_{50} \qquad [7\text{-}6]$$

$\lg[Y_{O_2}/(1 - Y_{O_2})]$ 对 $\lg pO_2$ 的线性图,即 Hill 曲线的斜率为 n,在 $\lg pO_2$ 轴上的截距为 $\lg p_{50}$(回忆线性方程 $y = mx + b$ 的斜率为 m 和在 x 轴上的截距为 $-b / m$)。

图 7-8 显示了肌红蛋白和血红蛋白的 **Hill 曲线**。对于肌红蛋白来讲,就像预料的那样,曲线是线性的,斜率为 1。虽然血红蛋白并不是像在推导 Hill 方程时假定的那样,在单一一步中结合氧气,然而对于处于 0.1～0.9 之间的 Y_{O_2} 值必须为线性。它的最大斜率出现在 $p_{O_2} = p_{50}[Y_{O_2}/(1 - Y_{O_2}) = 1]$ 附近,习惯上把它当作 Hill 常数。对于正常人血红蛋白来讲,Hill 常数在 2.8～3.0,即血红蛋白结合氧是高度的,但不是无限大的协同性。许多异常血红蛋白表现出较小的 Hill 常数(节 7-2D),表明它们的协同性比正常协同性低。

当 Y_{O_2} 接近 0,此时几乎没有血红蛋白结合一分子 O_2,血红蛋白的 Hill 曲线的斜率假设为 1(图 7-8,下边渐近线),这是因为血红蛋白亚基像肌红蛋白分子那样独立地竞争 O_2。在接近 1 时,此时每一个血红蛋白的 4 个 O_2 结合部位中至少有 3 个被占据,Hill 曲线的斜率假定为 1(图 7-8,上边渐近线),因为少数空的部位分布于不同的分子上,因此 O_2 结合是独立进行的。

把图 7-8 中靠下的渐近线外推到水平轴表明,按照式 7-6,$p_{50} = 30$ torr 时,第 1 个 O_2 分子与血红蛋白结合。同样如果把靠上的渐近线外推,当 $p_{50} = 0.3$ torr 时,血红蛋白结合第 4 个 O_2 分子。*第 4 个 O_2 结合到血红蛋白的亲和性比结合第 1 个 O_2 的亲和性大 100 倍*。这个差别就像我们在节 7-2C 中看到的那样,完全是由于球蛋白链对血红素的 O_2 亲和性的影响。

170

为了分析与血红蛋白的协同结合而进一步发展的模式比在导出 Hill 方程中用的更逼真,我们将在节 7-2E 中讨论。

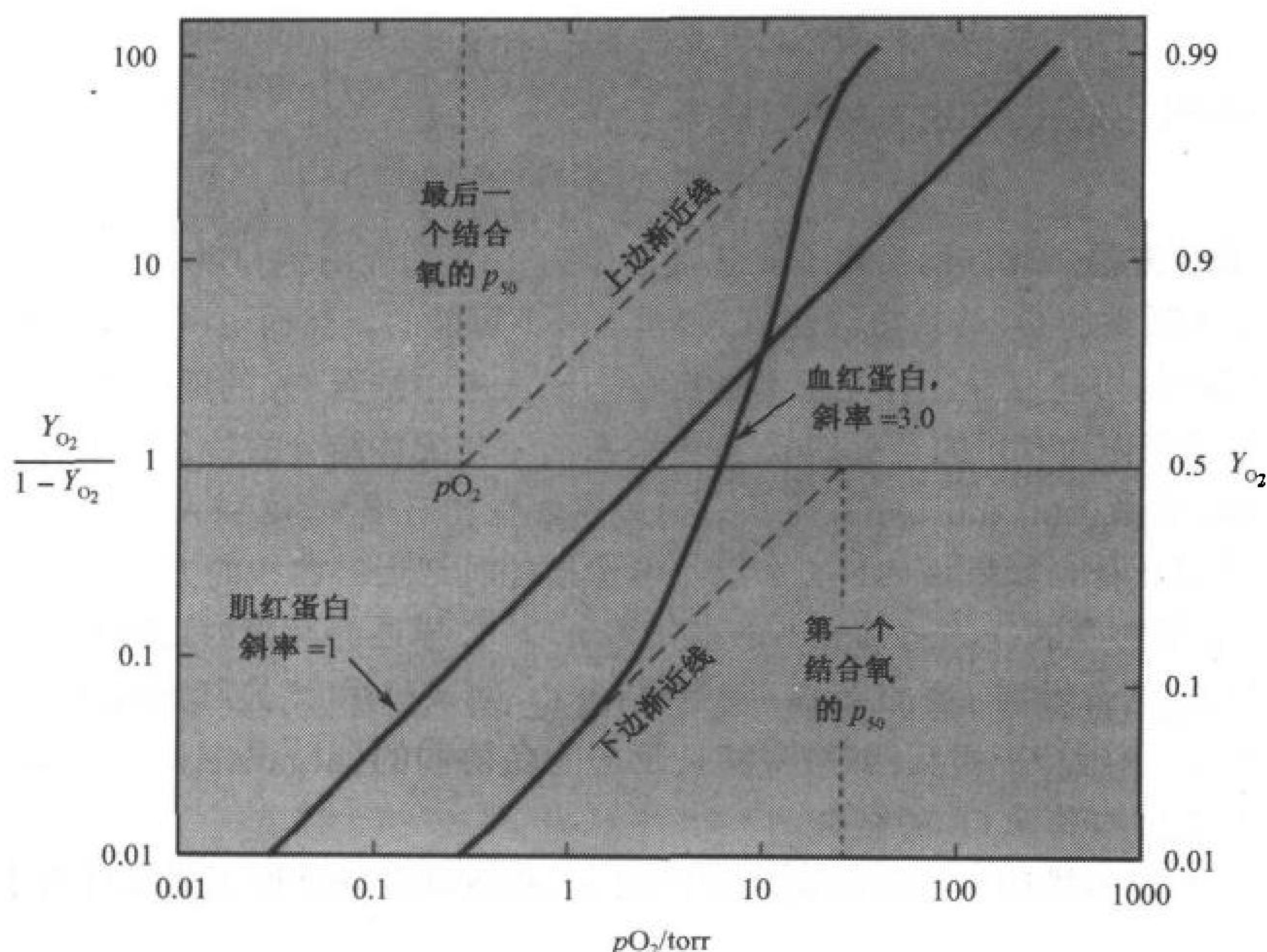


图 7-8 肌红蛋白和纯的血红蛋白的 Hill 曲线

注意这是一个双对数曲线。当 $pO_2 = p_{50}$时, $Y_{O_2}/(1-Y_{O_2})=1$。

C. 氧结合协同性的机理

氧气与血红蛋白结合的协同性源于一个血红素基团的配体结合状态对另一个血红素的配体结合亲和性的影响。然而血红素之间分开大约 25～30Å,由于距离太大因而静电相互作用很小。而有关一个血红素的 O_2 结合状态的信息是通过一个蛋白质的运动传递给另一个血红素的。这些运动造成了图 7-5 给出的氧合和脱氧血红蛋白四级结构的差异。

血红蛋白有两种构象状态

在对氧合和脱氧血红蛋白 X 射线晶体结构分析的基础之上,Perutz 提出了一个血红蛋白氧合的机制。*在* **Perutz 机制中**,*血红蛋白有两个稳定的构象状态*,**T 态**(*脱氧血红蛋白构象*)*和* **R 态**(*氧合血红蛋白构象*)。处于 T 态的所有 4 个亚基不同于处于 R 态亚基。氧的结合发动了一系列协同运动,在几微秒内这些运动导致了从 T 态到 R 态的转换:

1) 处于 T 态时,由于卟啉基的锥形顶朝向 His F8(图 7-9),每个血红素中的 Fe(II)位于血红素平面外面 0.6Å 处。O_2 结合改变了血红素的电子状态,使 Fe—$N_{卟啉键}$缩短了约 0.1Å,引起卟啉锥顶下沉。结果在 T→R 转换过程中,Fe(II)离子移入到血红素的中心。
2) Fe(II)拉着与它共价连接的 His F8 随之运动。然而,如果 His F8 直接向血红素平面移动 0.6Å,将与血红素相撞。为避免空间碰撞,F 螺旋倾斜并且横跨血红素平面移动了约 1Å 的距离。
3) 三级结构的变化与血红蛋白 4 个亚基重排中的转换相偶联。通过 T→R 过渡产生的最

大变化导致位于 α_1-β_1 和 α_2-β_1 界面残基的移动。在 T 态中 β 链中的 His FG4(97)(连接 F、G 螺旋片段的第 4 个残基,也是总的第 97 个残基)与 α 链中的 Thr C6(41)(C 螺旋的第 6 个残基,总第 41 个残基)(图 7-10a)接触。然而在 R 态中 His FG4 接触 Thr C3(38),沿着 C 螺旋形成了一个回折(图 7-10b)。在两种构象中一个亚基中的"突起"与另一个亚基的"凹沟"很好地啮合。由于运动使得 His FG4 和 ThrC6 太靠近(即 knobs on knobs),中间位置被压得很紧。

4) 每个处于 T 态的血红蛋白中的每个亚基的 C 端残基(Arg141α 和 His146β)都参与亚基内和亚基间的使 T 态稳定的离子对形成(图 7-11)。然而,T→R 过渡中的构象转换在由 Fe—O_2 键形成能量驱动的过程中将这些离子对拆开。 171

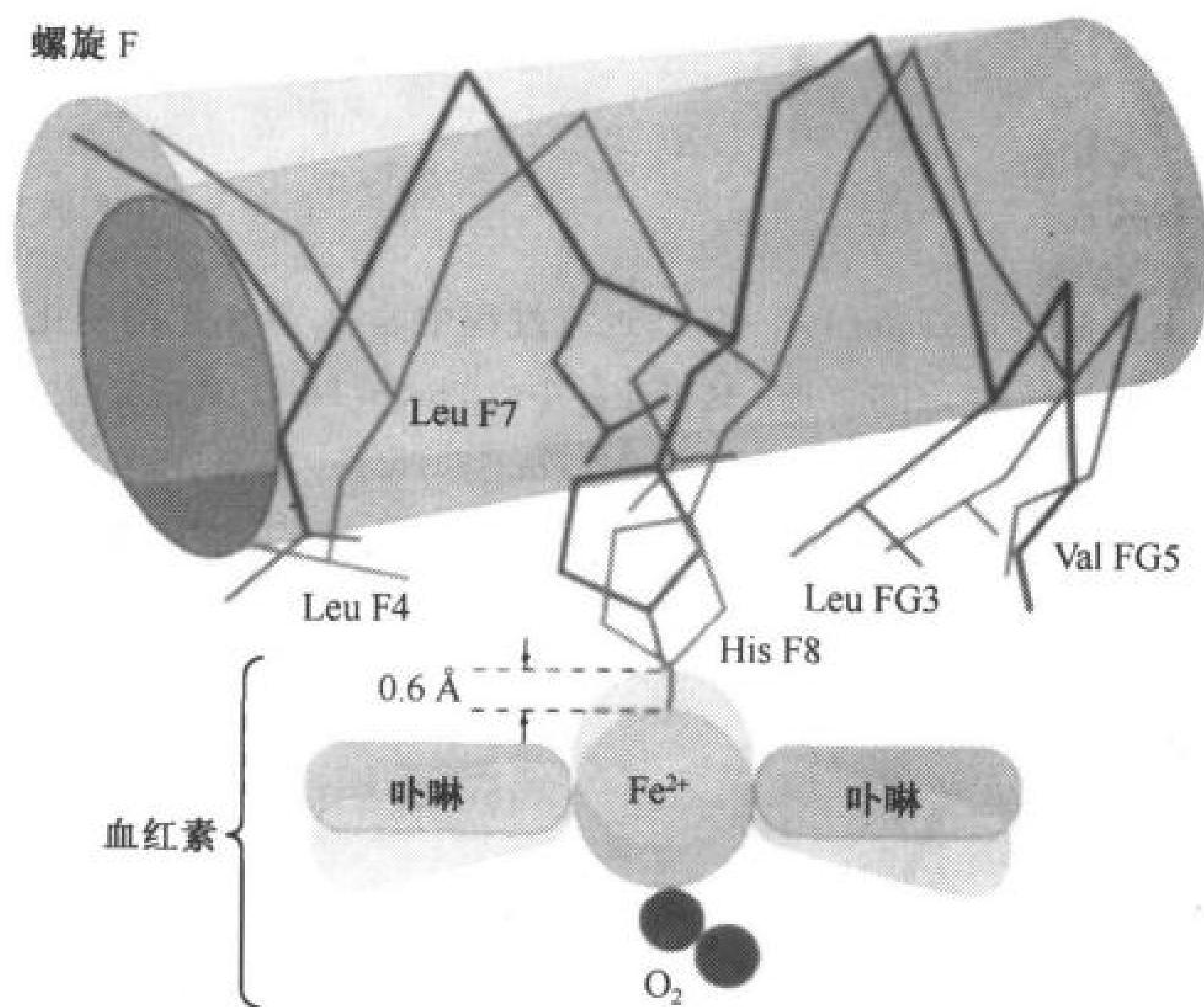


图 7-9　血红蛋白 T→R 过渡期间血红素和 F 螺旋的运动

在 T 态(蓝色),Fe 位于成锥形的卟啉环上方 0.6Å 处。在 R 态(红色),Fe 移进非锥形的卟啉环的平面,在那里可更紧密结合 O_2,而且拉着 His F8 和 F 螺旋。

血红蛋白 T→R 态过渡的基本特征是它的亚基偶联得如此紧密,以至于没有整个四聚体蛋白中四级结构的变化就不可能使一个亚基内的三级结构发生大的变化。血红蛋白被限制只能有两种四级结构形式,T 态和 R 态,因为在图 7-10 中所示的亚基间接触作用像一个双向开关一样,使得相关的亚基只允许有两种稳定的位置。α_1-β_1 和 α_2-β_2 界面的柔性要求 T→R 转换在 α_1-β_1 和 α_2-β_2 的两个界面上同时发生。没有一个亚基或二聚体能够独立地较大幅度地改变它的构象。 172

我们现在从结构上推理氧与血红蛋白结合的协同性。T 态血红蛋白具有低的 O_2 亲和性,主要是因为它的 Fe—O_2 键比 R 态的长 0.1Å(即图 7-9 中蓝色的图)。实验表明,当至少有一个 O_2 已经与 αβ 二聚体结合时,T 态血红蛋白分子中的应力足可以将 C 末端的离子对拆开,从而使血红蛋白快速进入 R 态,随即所有的亚基同时转变为 R 态构象,不管它们是否和 O_2 结合。处于 R 态构象未结合配体的亚基对氧的亲和性增加是因为它们已经处于 O_2 结合构象了。这可说明接近饱和的血红蛋白的高氧亲和性。

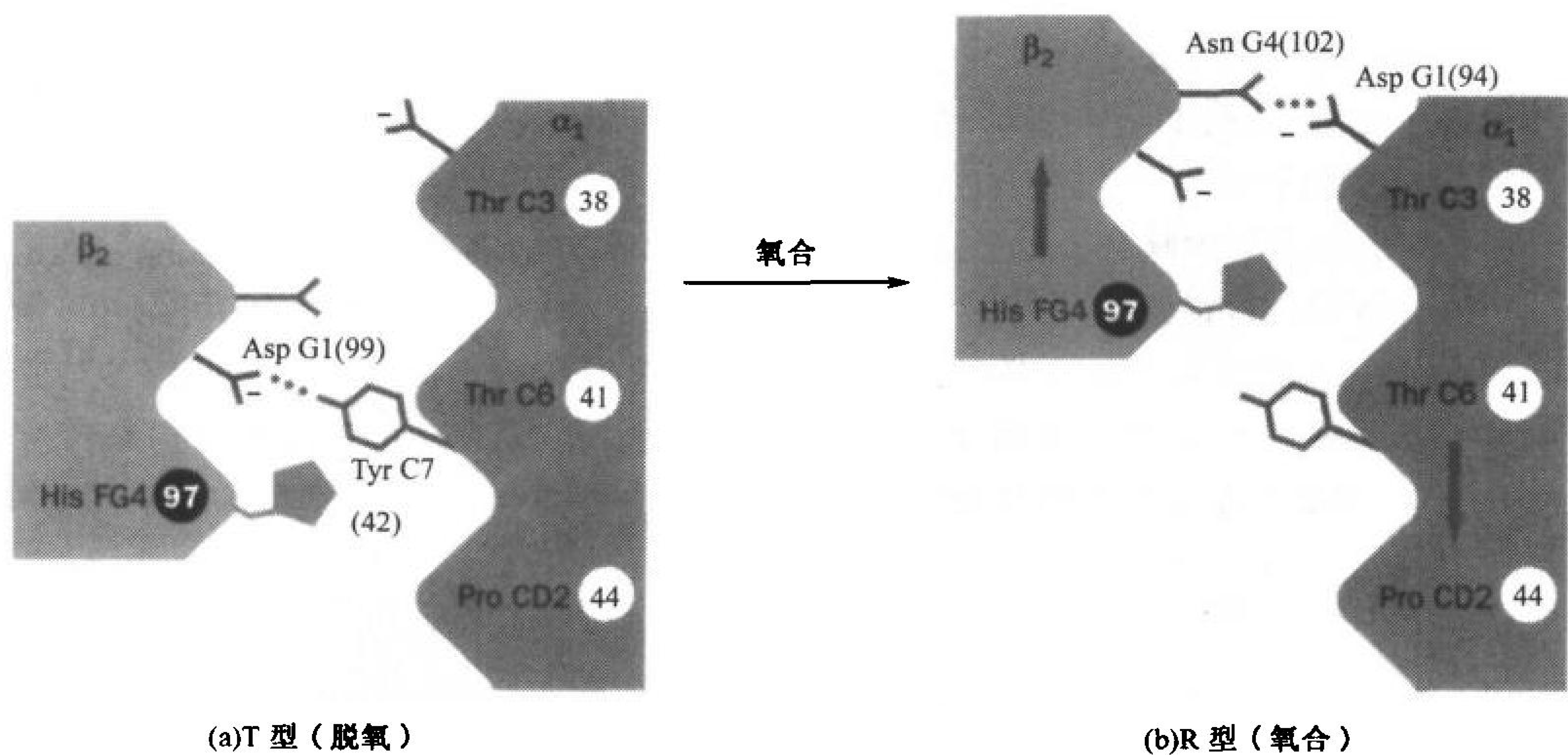


图 7-10 血红蛋白 T→R 态过渡过程中 α_1-β_2 界面上的变化

(a)在 T 态中，β_2 链的 His FG4(His97)刚好能进入链靠近 α_1 中的 ThrC6(Thr41)的螺旋沟中。(b)在 R 态中，由于 C 螺旋的旋转 His FG4 改变了位置，转向靠近 α_1 链的 ThrC3(Thr38)的位置。在图 7-5 和图 7-6 中也能看到这些相互作用。注意，在两种构象中，亚基是通过不同的但是等价的氢键连接的。在 T→R 过渡期间，亚基从一个位置猛然转向另一个位置而没有稳定的中间体。

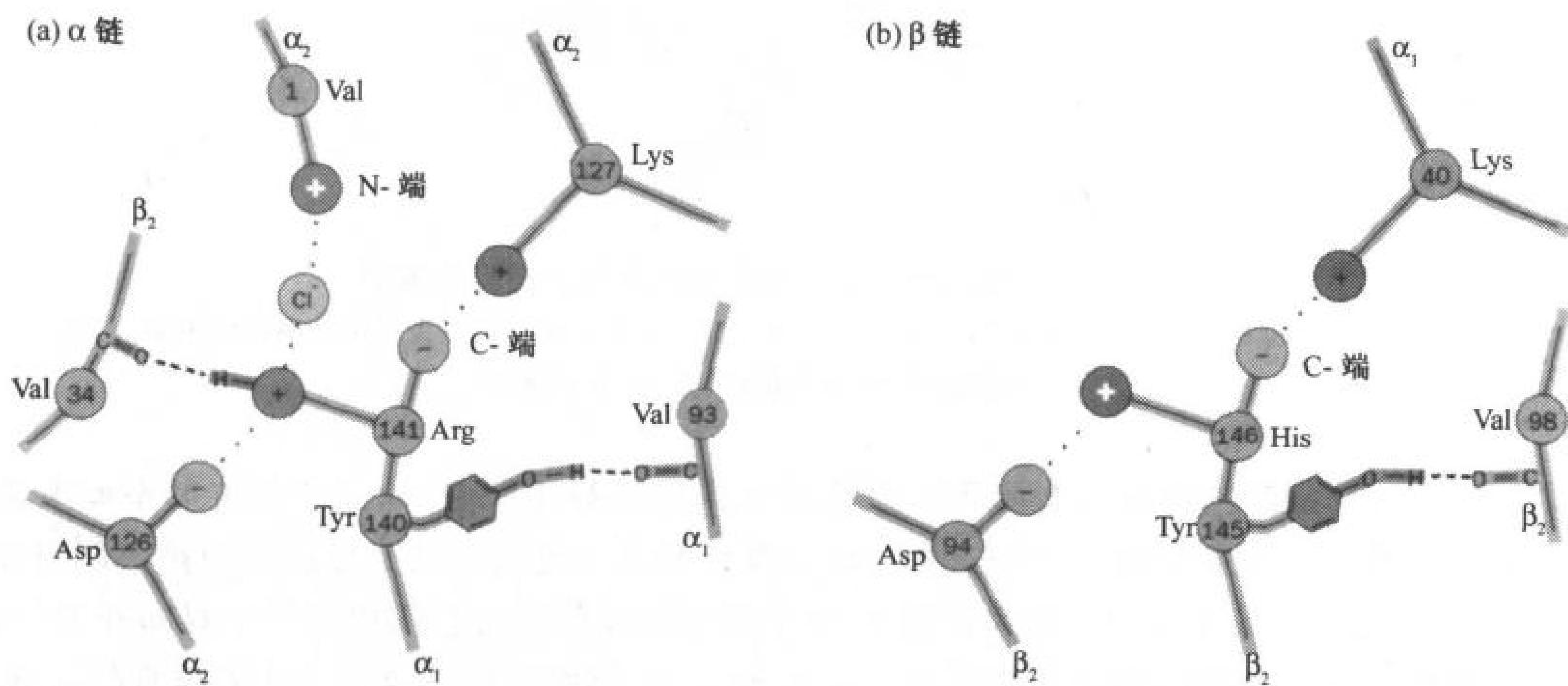


图 7-11 脱氧血红蛋白中的离子对和氢键的网络

有(a)α 链和(b)β 链的最后两个残基参与的这些键在 T→R 过渡时都被破坏。
在 R 态中两个部分脱质子的基团(部分 Bohr 效应)用白色加号给出。

二氧化碳的转运和 Bohr 效应

当氧结合时血红蛋白发生的构象变化降低了几个基团的 pK 值，其中包括 α 亚基 N 末端的氨基和 β 亚基 C 末端的 His 基团(图 7-11)。在 T 态的血红蛋白中，这些带正电的酸性基团参与离子对的形成，这增加了它们的 pK 值(使它们更显碱性)，而在 R 态中却没有这样的相互作用。

结果是在生理条件下，血红蛋白与每一个氧分子结合就释放出大约0.6个质子。反过来使pH增加，即除去质子，促进血红蛋白在低氧分压下结合更多的O_2（图7-12）。这种现象称为**Bohr效应**。这样命名是因为Christian Bohr（物理学家Niels Bohr的父亲）在1904年报道了这种现象。

Bohr效应在把氧从肺转运到呼吸组织和把呼吸组织产生的CO_2转运回肺的过程中起着重要的生理功能（图7-13）。呼吸组织产生的CO_2从组织扩散到毛细血管，溶解了的CO_2缓慢形成了HCO_3^-，反应式为$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons H^+ + HCO_3^-$，然而在**红细胞**（erythrocyte, red blood cell）中**碳酸酐酶**（carbonic anhydrase）大大加速了这一反应，这样，血中大多数的CO_2以HCO_3^-的形式被转运。

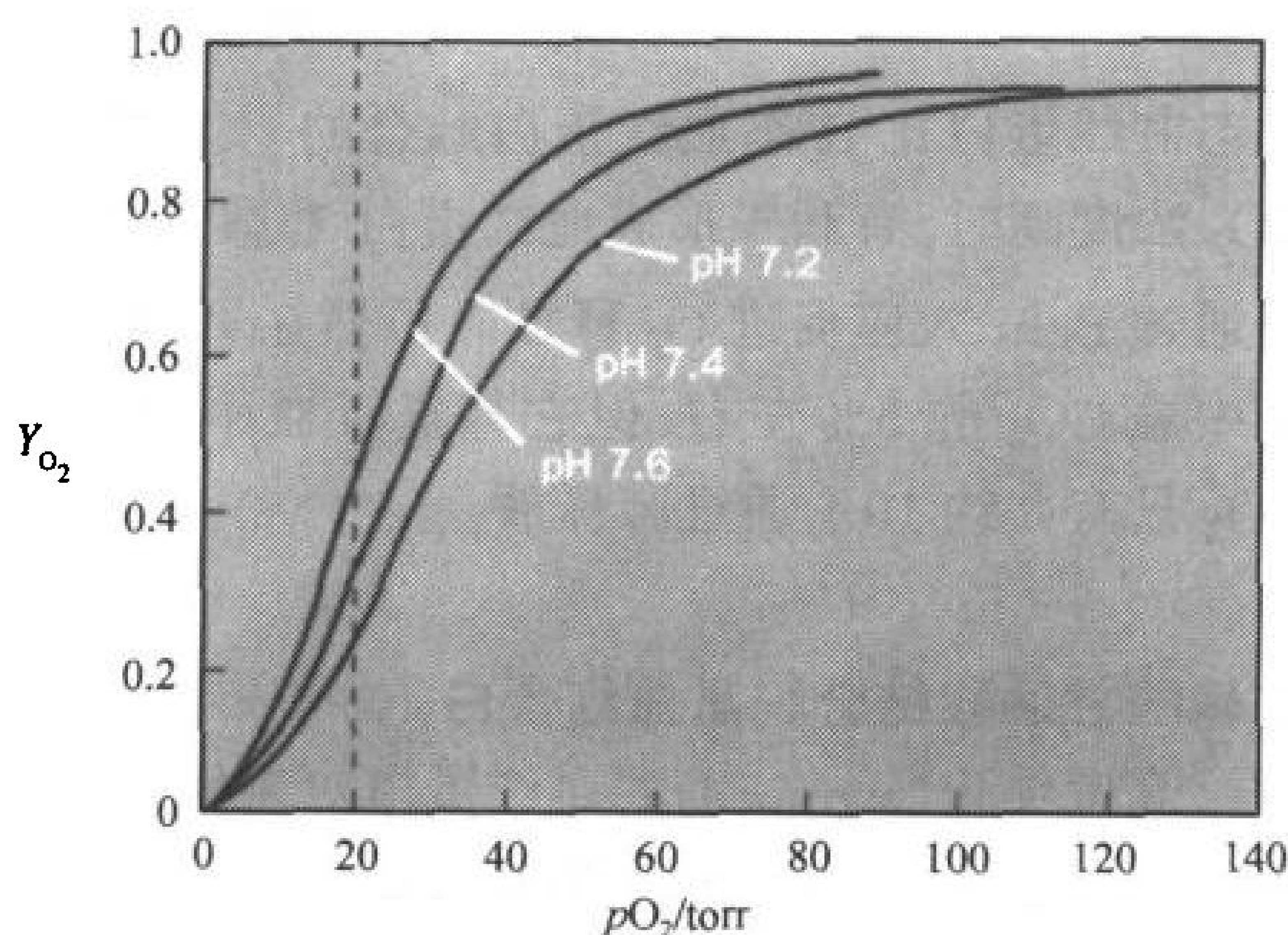


图7-12 Bohr效应

血红蛋白对氧气的亲和性随pH的增加而增加。虚线表示活跃呼吸的肌肉中的pO_2。[引自Benesch, R. E. and Benesch, E., Adv. Protein Chem. 28, 212 (1974)]

在毛细血管中，氧分压较低，HCO_3^-形成过程中产生的H^+被血红蛋白接受而形成T态的离子对，这样诱导血红蛋白释放氧，H^+被吸收后，通过促进HCO_3^-的形成更有利于CO_2转运。相反，在肺中，氧分压较高，血红蛋白与O_2结合破坏了T态离子对，从而形成R态，释放Bohr质子，H^+与HCO_3^-结合排出CO_2，这些反应紧密配合，使血液中的pH变化极小（见框2-2）。

173

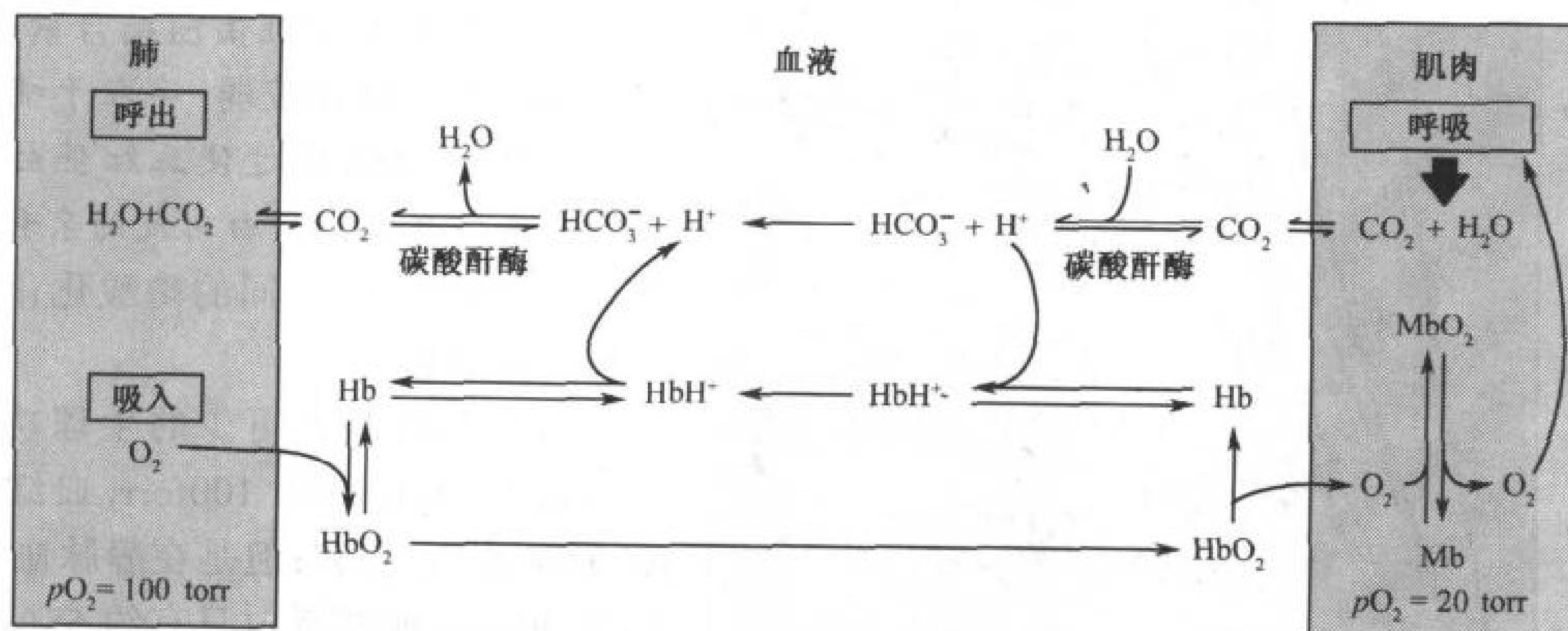


图7-13 *功能的秘诀*：血红蛋白和肌红蛋白在将O_2从肺运送到呼吸组织中和把CO_2（作为HCO_3^-）从组织运送到肺过程中的作用

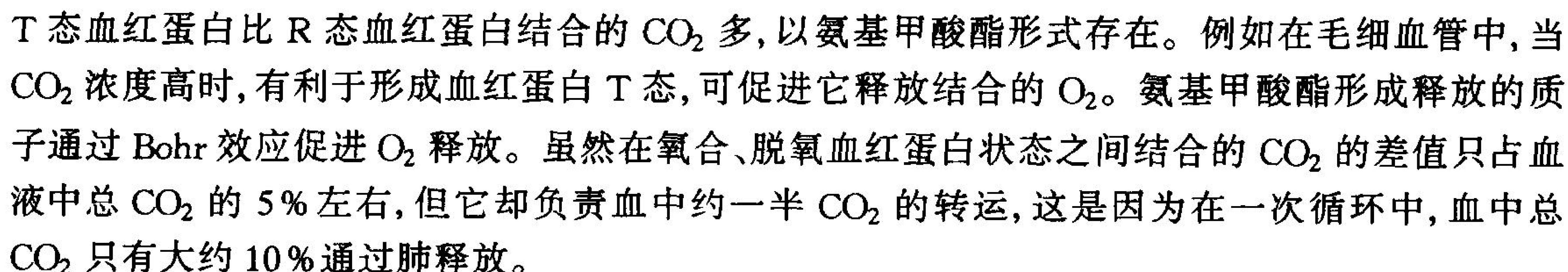
吸入肺中的O_2的pO_2较高，它和血中的血红蛋白结合。然后O_2被运送到pO_2较低的呼吸组织中，O_2从Hb上解离并扩散到组织中，用来把代谢燃料氧化成CO_2和H_2O。在快速呼吸的肌肉细胞中，O_2首先和肌红蛋白结合（它的O_2亲和性比血红蛋白的高）。其作用是增加了O_2的溶解度，从而加快了它从毛细血管扩散到组织中的速度。然后Hb和CO_2（多数是HCO_3^-）回到肺，在那里CO_2被呼出。

Bohr效应使得更多的氧能被转运到激烈运动的肌肉中，那里的$pO_2 < 20$torr。这样的肌肉

产生乳酸(节 14-3A)非常快,以至于流经这些组织血液的 pH 由 7.4 降为 7.2。当 pO_2 为 20torr 时,血红蛋白在 pH7.2 时比在 7.4 时释放的氧气大约多 10%(图 7-12)。

CO_2 通过与血液中蛋白质的 N 端氨基可逆地结合形成氨基甲酸酯,也可调节 O_2 与血红蛋白的结合。

$$R—NH_2 + CO_2 \rightleftharpoons R—NH—COO^- + H^+$$

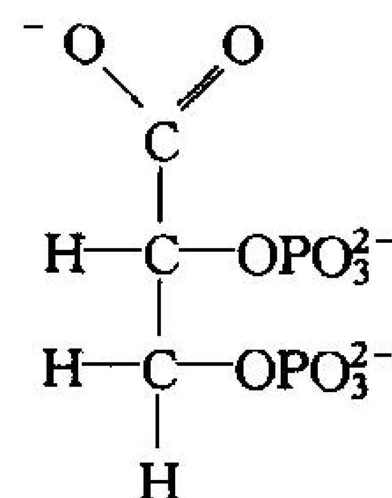


T 态血红蛋白比 R 态血红蛋白结合的 CO_2 多,以氨基甲酸酯形式存在。例如在毛细血管中,当 CO_2 浓度高时,有利于形成血红蛋白 T 态,可促进它释放结合的 O_2。氨基甲酸酯形成释放的质子通过 Bohr 效应促进 O_2 释放。虽然在氧合、脱氧血红蛋白状态之间结合的 CO_2 的差值只占血液中总 CO_2 的 5%左右,但它却负责血中约一半 CO_2 的转运,这是因为在一次循环中,血中总 CO_2 只有大约 10%通过肺释放。

二磷酸甘油酸结合脱氧血红蛋白

高度纯化(stripped)的血红蛋白对氧的亲和性比在全血中的血红蛋白大得多(图 7-14),这使得 Joseph Barcroft 在 1921 年推测血中还含有 CO_2 以外的物质影响 O_2 与血红蛋白的结合,这种物质就是 **D-2,3-二磷酸甘油酸(BPG)**。

174



D-2,3-二磷酸甘油酸

图 7-14 BPG 和 CO_2 对血红蛋白 O_2 解离曲线的影响
没结合 BPG 和 CO_2 的血红蛋白(左)比全血中的血红蛋白的 O_2 亲和性高。加入 BPG 或 CO_2 或者二者都加入使解离曲线右移(降低了血红蛋白的 O_2 亲和性)。[引自 Kilmartin, J. V. and Rossi-Bernardi, L., Physiol. Rev. 53 884 (1973)]

BPG 与脱氧血红蛋白结合紧密,而与氧合血红蛋白结合较弱,*存在于哺乳动物红细胞中的 BPG 通过使血红蛋白保持脱氧构象来降低血红蛋白对氧的亲和性*。在其他脊椎动物中,不同的磷酸化化合物扮演同样的角色。

BPG 具有必不可少的生理功能。在动脉血中,pO_2 约为 100torr,血红蛋白约有 95%被 O_2 饱和;但是在静脉血中,pO_2 约为 30torr,血红蛋白只有约 55%被氧饱和(图 7-7)。这样,在通过毛细血管时,血红蛋白卸载了约 40%的结合氧。在缺乏 BPG 的情况下,由于血红蛋白对氧气的亲和力增加,释放的结合氧很少,这样使 O_2 的解离曲线向 pO_2 降低的方向移动了许多(图 7-14)。BPG 在适应高山反应方面也有重要的作用(见框 7-2)。

框 7-2 健康和疾病的生物化学

高度适应性

随着海拔高度的上升,气压下降,在海拔 10 000 英尺的高度上,氧分压只有海平面的 70%,约为 110torr。为了维持正常的动脉血 pO_2 水平(pO_2 水平低于 85torr 将导致智力损伤),需要有多种生理响应。

高度适应性是一个复杂的过程,它包括每一个红细胞中的血红蛋白数量和红细胞数量的增加,这在正常情况下需要几周时间实现。每一个到过较高海拔的人都知道,只要在那里呆一天就会有明显的适应。这是由于红细胞中大量合成了 BPG,BPG 的增加降低了血红蛋白与 O_2 的亲和性,通过升高 p_{50} 增加血红蛋白在毛细血管中释放氧的数量(摄取和注射 BPG 没有效果,因为 BPG 不能穿过红细胞膜)。对于患有诸如各种贫血和冠状动脉缺血病等限制血的氧合(低氧症)的病人来讲,BPG 浓度也会有类似的增加。

红细胞中 BPG 浓度的调节比血红蛋白的合成要快得多。BPG 的水平也是一个比改变呼吸速度更灵敏的动脉 pO_2 的调节剂。过度呼吸是另一个对高度的早期反应,可能导致呼吸性碱中毒(框 2-2)。有趣的是,与生活在较低海拔高度的人们相比,生活在安第斯山和喜马拉雅山地区的人们的肺活量高、血红蛋白水平高和右心室增大(反映出心脏输出能力)。

对 BPG-脱氧血红蛋白复合物的 X 射线晶体结构分析表明,BPG 结合在脱氧血红蛋白的中央洞穴中(图 7-15)。BPG 的阴离子基团处于两个 β 亚基 N 末端氨基的氢键和离子对区内。T 态向 R 态的转换引起两个 βH 螺旋靠近,这使中央空穴变窄,并排斥 BPG。它也使 β N 端氨基基团的距离从 16Å 加宽到了 20Å,从而阻止了它们同时与 BPG 的磷酸基团形成氢键。因此,BPG 通过与血红蛋白 β 亚基间形成交联稳定了血红蛋白的 T 态构象,使得 T ⇌ R 的平衡向 T 态转移,从而降低了血红蛋白对 O_2 的亲和性。

175

胎儿血红蛋白具有较低的 BPG 亲和性

BPG 也有帮助胎儿供氧的作用。胎儿通过胎盘从母体循环获得 O_2。成年人和胎儿的红细胞中的 BPG 浓度是一样的,但是 BPG 与成年人血红蛋白的结合要比与胎儿血红蛋白的结合更紧密。胎儿血红蛋白与氧气的亲和力越高,越容易将 O_2 传给到胎儿。

胎儿血红蛋白的亚基组成为 $\alpha_2\gamma_2$,其中 γ 亚基是 β 链的突变体(节 5-4B)。β 链的第 143 残基为阳离子的 His 残基,而 γ 链的相应位置上是一个不带电的 Ser 残基。缺少 His 将消除稳定 BPG-脱氧血红蛋白复合物的一对相互作用(图 7-15)。

D. 异常的血红蛋白

176

在 DNA 重组技术发展之前,突变了的血红蛋白实际上为蛋白质结构与功能的研究提供了惟一的机会。这是因为许多年以来,血红蛋白是惟一已知结构的蛋白质,有大量已知特征的天然**突变体**(variant)。通过对患有生理缺陷个体的研究以及对人血样品的常规电泳筛选,导致了将近 500 个突变血红蛋白的发现。其中约 95% 的突变只是由于球蛋白多肽链中单个氨基酸取代造成的。实际上,世界上有 5% 的人口携带有可遗传的突变的血红蛋白。

并非所有的血红蛋白的突变都出现临床症状,但是有一些不正常的血红蛋白分子肯定会引起体虚的病症(当然自然产生的致死的血红蛋白突变体还从未看到)。表 7-1 列出了几种此类血

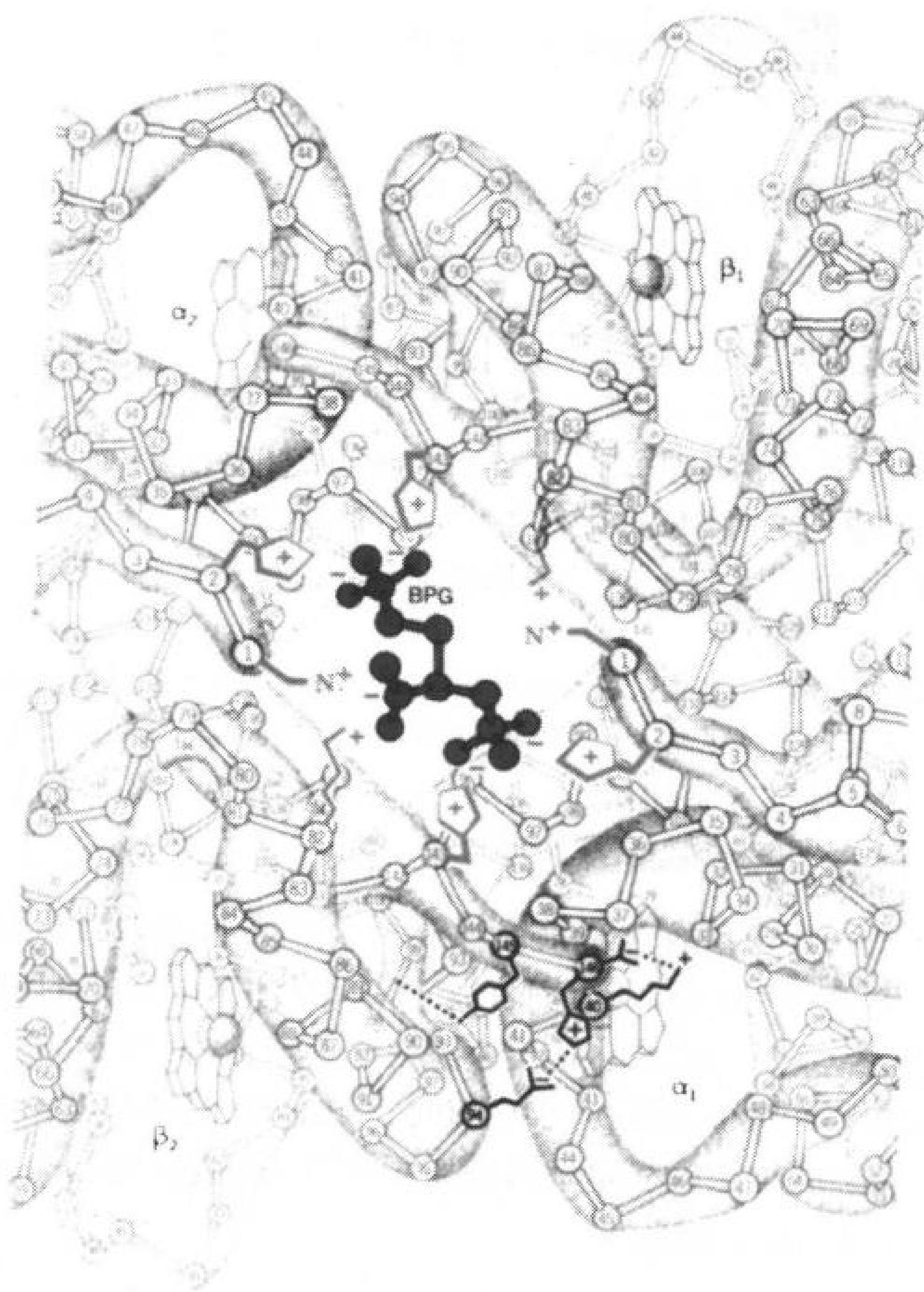


图 7-15 BPG 和脱氧血红蛋白的结合

BPG(红色)结合在血红蛋白的中央空穴中。BPG 在生理状况下带的电荷为 − 5,它被从两个 β 亚基伸出的 8 个阳离子基团(蓝色)包围。在 R 态中,中央空穴太小,不能容纳 BPG。帮助稳定 T 态(图 7-11b)的离子对和氢键在右下标出。(引自 Irving Geis)

红蛋白突变体。导致血红蛋白三级和四级结构不稳定的突变改变了血红蛋白对氧的亲和性(p_{50})和降低了它的协同性(Hill 常数)。而不稳定的血红蛋白被红细胞降解,降解产物常常会引起红细胞**裂解**(lyse),导致**溶血性贫血**(hemolytic anemia,贫血是红细胞减少病症),从而危及 O_2 传递到组织。

在 O_2 结合部位的一些突变有利于 Fe(II)氧化为 Fe(III),带有这样的高铁血红蛋白的病人表现出青紫症,皮肤青紫色,这是由于动脉血中存在高铁血红蛋白。这些血红蛋白具有低的协同性(Hill 常数约为 1.2,而最大值为 2,因为在此种高铁血红蛋白中只有两个亚基能结合氧气)。

增加血红蛋白与氧气亲和性的突变导致了红细胞数量的增加,可以弥补与正常情况相比在组织中释放氧气的不足。出现这种情况的个体[称为**红细胞增多症**(polycythemia)]脸色往往红润。

表 7-1　一些血红蛋白突变体

名称[a]	突变	效应
Hammersmith	Phe CD1(42)β→Ser	削弱血红素结合
Brisol	Val E11(67) β→Asp	削弱血红素结合
Bibba	Leu H19(136)α→Pro	破坏 H 螺旋
Savannah	Gly B6(24)β→Val	破坏 B-E 螺旋界面
Philly	Tyr C1(35)α→Phe	破坏 α_1-β_1 界面上的氢键
Boston	His E7(58)α→Tyr	促进高铁血红蛋白形成
Milwaukee	Val E11(67)β→Glu	促进高铁血红蛋白形成
Iwate	His F8(87)α→Tyr	促进高铁血红蛋白形成
Yakima	Asp G1(99)β→His	破坏稳定 T 构象的一个氢键
Kansas	Asn G4(102)β→Thr	破坏稳定 R 构象的一个氢键

[a]血红蛋白突变体经常以发现地命名(例如血红蛋白 Hammersmith)。

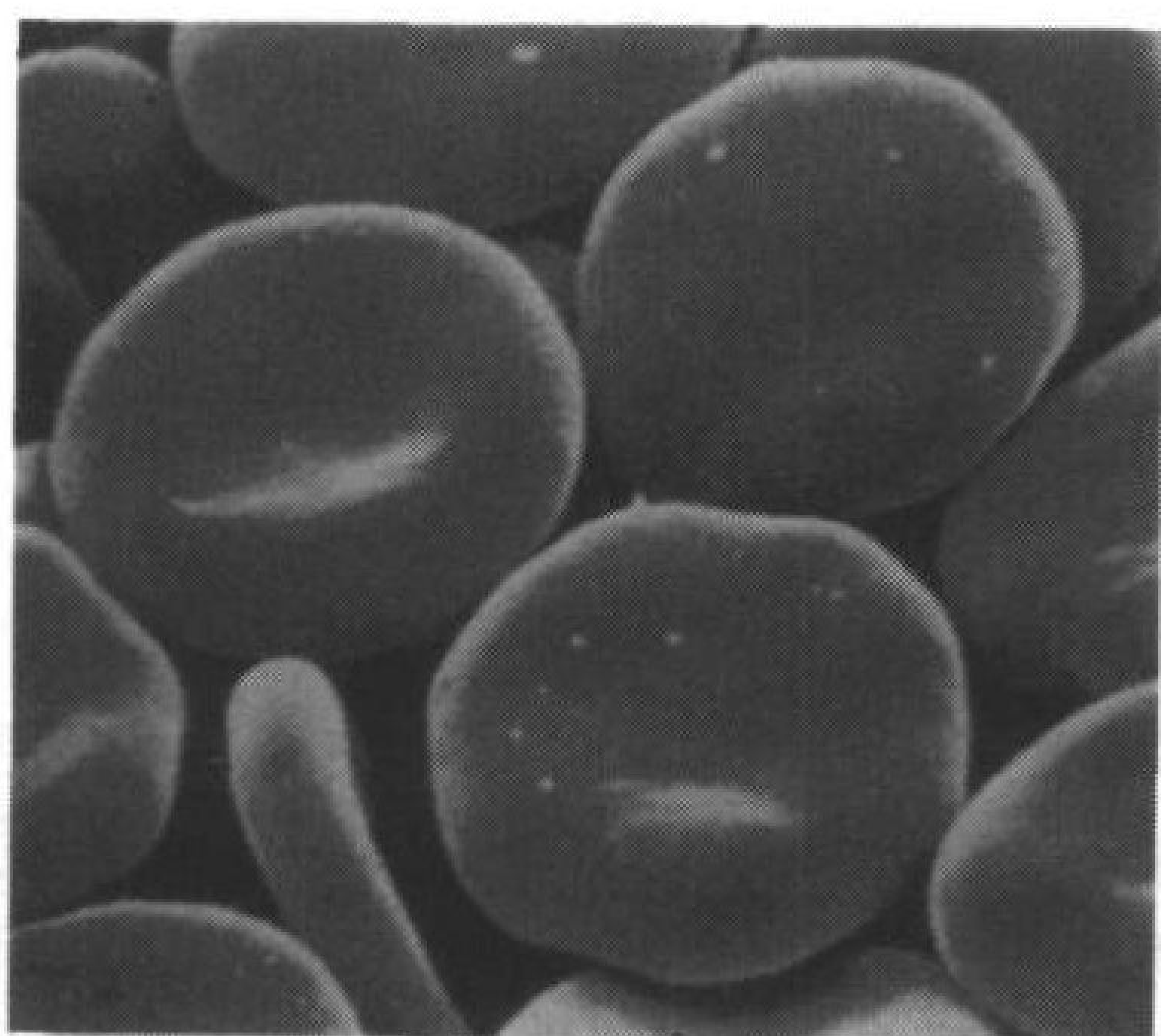
镰状细胞贫血病

大多数有害的血红蛋白突变体只出现在少数个体中,在许多这样的个体中突变明显是原发的。然而约 10%的美国黑人及 25%的非洲黑人携带有一个单拷贝的[**杂合型**(heterozygous)]编码**镰状细胞血红蛋白(血红蛋白 S)**的基因,而携带两个拷贝的[**纯合型**(homozygous)]编码血红蛋白 S 基因的个体患有**镰状细胞贫血病**(sickle-cell anemia),在这类细胞中血红蛋白 S 形成了不溶性纤维,使红细胞变形(图 7-16)。在这种痛苦的、令人疲劳的、经常是致命的疾病中,镰状细胞往往不易通过毛细血管,严重时,流经某些组织的血液可能会被完全堵塞,导致组织死亡。而且,畸形细胞很脆,容易导致溶血性贫血。在杂合子中,约 40%的血红蛋白为血红蛋白 S,他们红细胞的寿命虽然比正常的短,但是他们能过正常的生活。

177

在 1945 年,Linus Pauling 提出了一个假说,他认为镰状细胞贫血病源于血红蛋白的突变,但是直到 1956 年,这种分子缺陷才被发现。Vernon Ingram 发现血红蛋白 S 的每一个 β 链的第 6 个残基是 Val 而不是正常的 Glu,这是第一次发现蛋白质中单个氨基酸的突变导致了遗传性疾病。

脱氧血红蛋白 S 的 X 射线晶体衍射结构分析表明,每个血红蛋白 S 分子的一个突变的 Val 侧链进入了位于另一个血红蛋白分子 β 亚基表面的疏水口袋中(图 7-17)。这种分子间的相互接触使得血红蛋白 S 分子形成了线状聚合物。14 条彼此缠绕的链聚集形成了一个直径约为 220Å 的纤维。这些纤维使整个红细胞的长度变长(图 7-18)。β 亚基疏水口袋不能容纳正常的 Glu 侧链,而且在氧合血红蛋白中不存在疏水口袋。因此,无论是正常的血红蛋白还是氧合血红蛋白 S 都不能形成多聚体。实际上,血红蛋白 S 纤维在氧合时迅速溶解,所以在动脉血中没有血红蛋白 S 纤维出现。当红细胞通过毛细血管脱氧时,形成镰状的细胞危险性最大。血红蛋白 S 分子的聚合与时间和浓度有关,这可解释为什么血液阻塞只是偶尔发生(就只在镰状细胞“危机”中)。



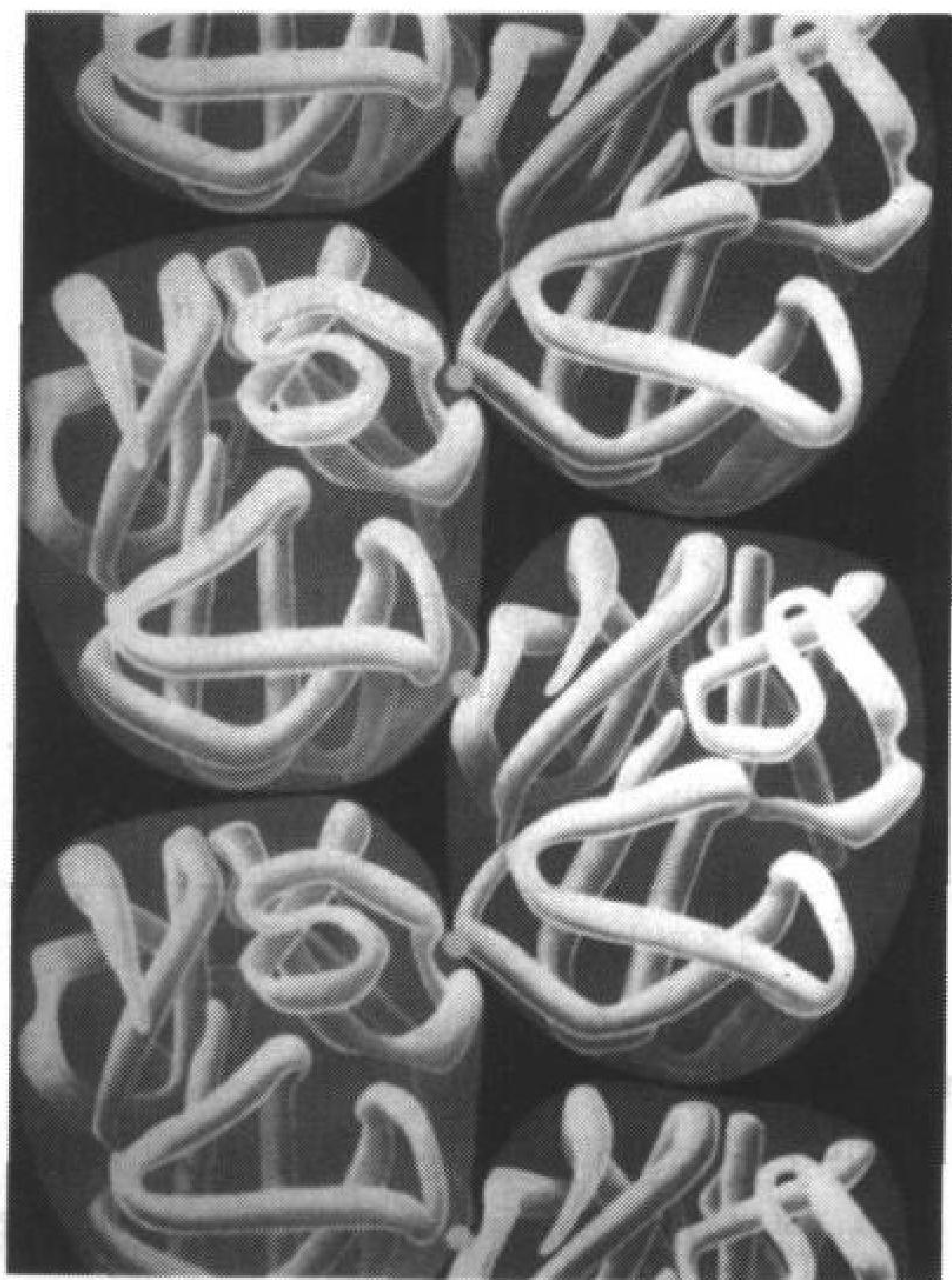
(a)



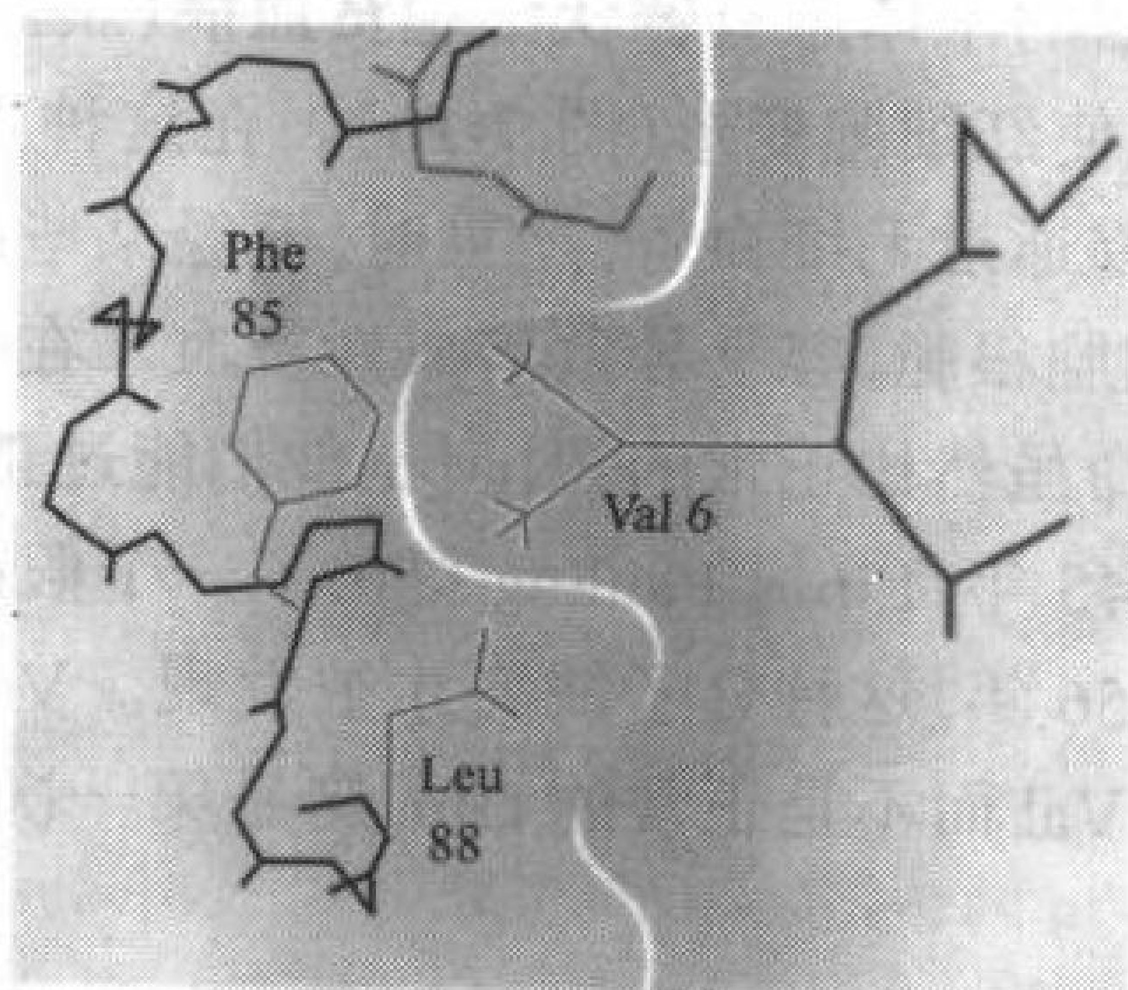
(b)

图 7-16 人红细胞的扫描电镜图

(a)正常的红细胞是柔性的两面凹的圆盘，在通过毛细血管（许多毛细血管的直径比红细胞小）时可以承受轻微的形变。（引自 David M. Phillips/Visuals limited）。(b)来自镰状细胞贫血病的个体的镰状红细胞，它们长且僵硬，不容易通过毛细血管。（引自 Bill Longcore）



(a)



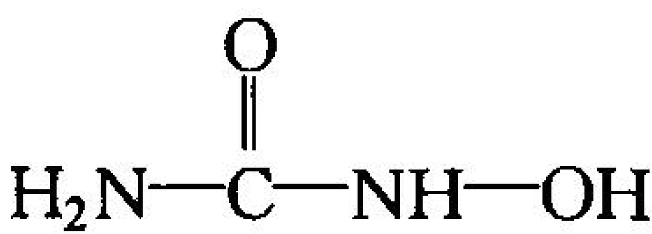
(b)

图 7-17 脱氧血红蛋白 S 纤维的结构

(a)脱氧血红蛋白 S 分子在纤维中的排列。只显示了每一个血红蛋白 S 分子中的三个亚基。(b)一个血红蛋白 S 分子 β_2 链中突变的 Val 6 的侧链（a 中的黄色凸起）和位于相邻脱氧血红蛋白 S 分子的 β_1 亚基上的疏水口袋结合。（引自 Irving Geis）

有趣的是，许多血红蛋白 S 纯合个体的镰状细胞贫血病仅是温和型的，因为他们表达出的胎儿血红蛋白的水平相对较高，胎儿血红蛋白含有 γ 链而不是有缺陷的 β 链。使用**羟（基）脲**（hy-

droxyurea)



可以增加含有胎儿血红蛋白的细胞量[羟(基)脲作用机理还不清楚],缓解镰状细胞贫血病的症状。增加的胎儿血红蛋白稀释了血红蛋白 S,使它在红细胞从组织到肺中再结合氧的 10～20s 内较难聚集在一起。

在现代的缓解疗法开始之前,患有镰状细胞贫血病的个体很少能活到成年。然而,自然选择并没有降低血红蛋白 S 突变体的存在,因为杂合子对**疟疾**(malaria)(框 7-3)有较强的抵抗力。

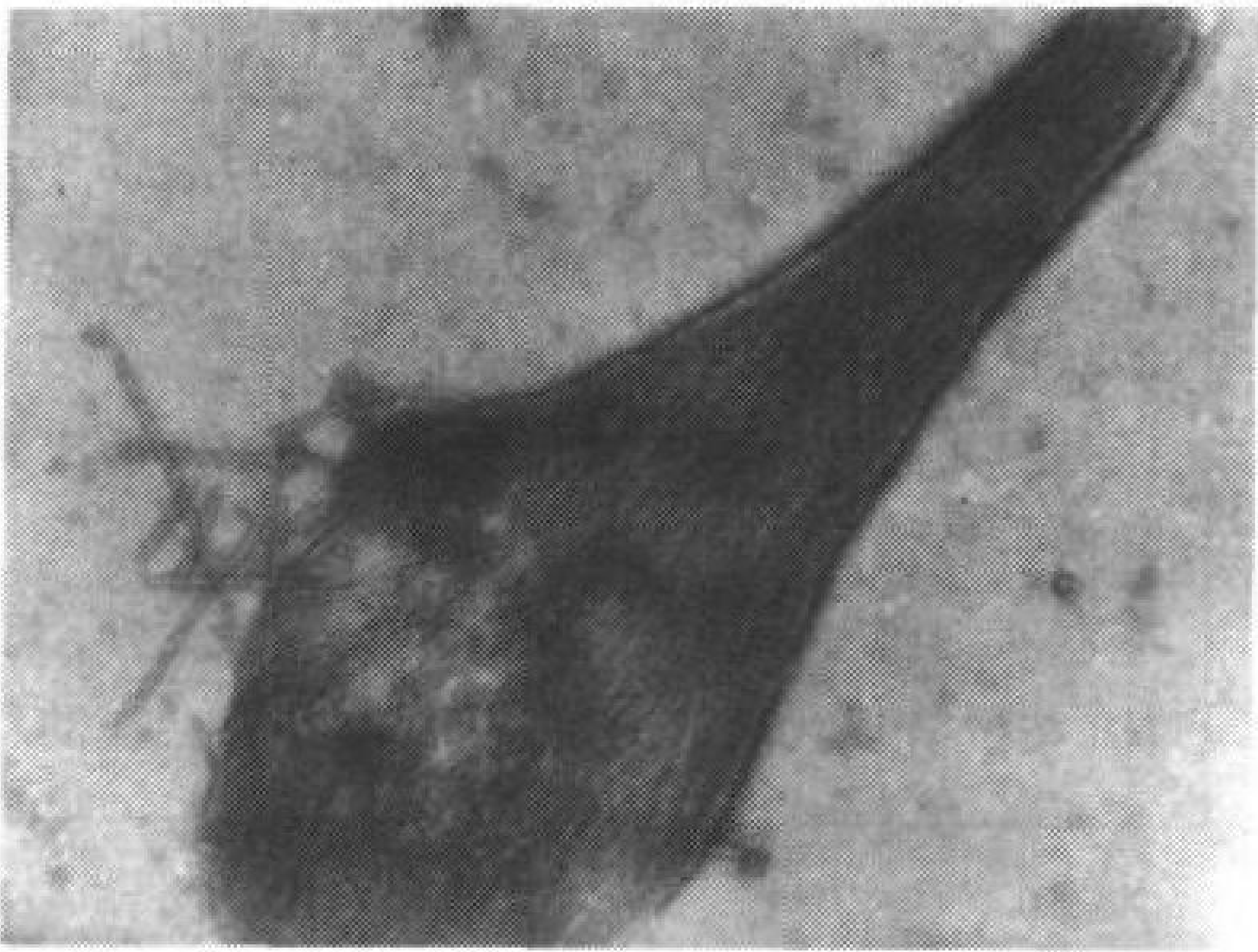
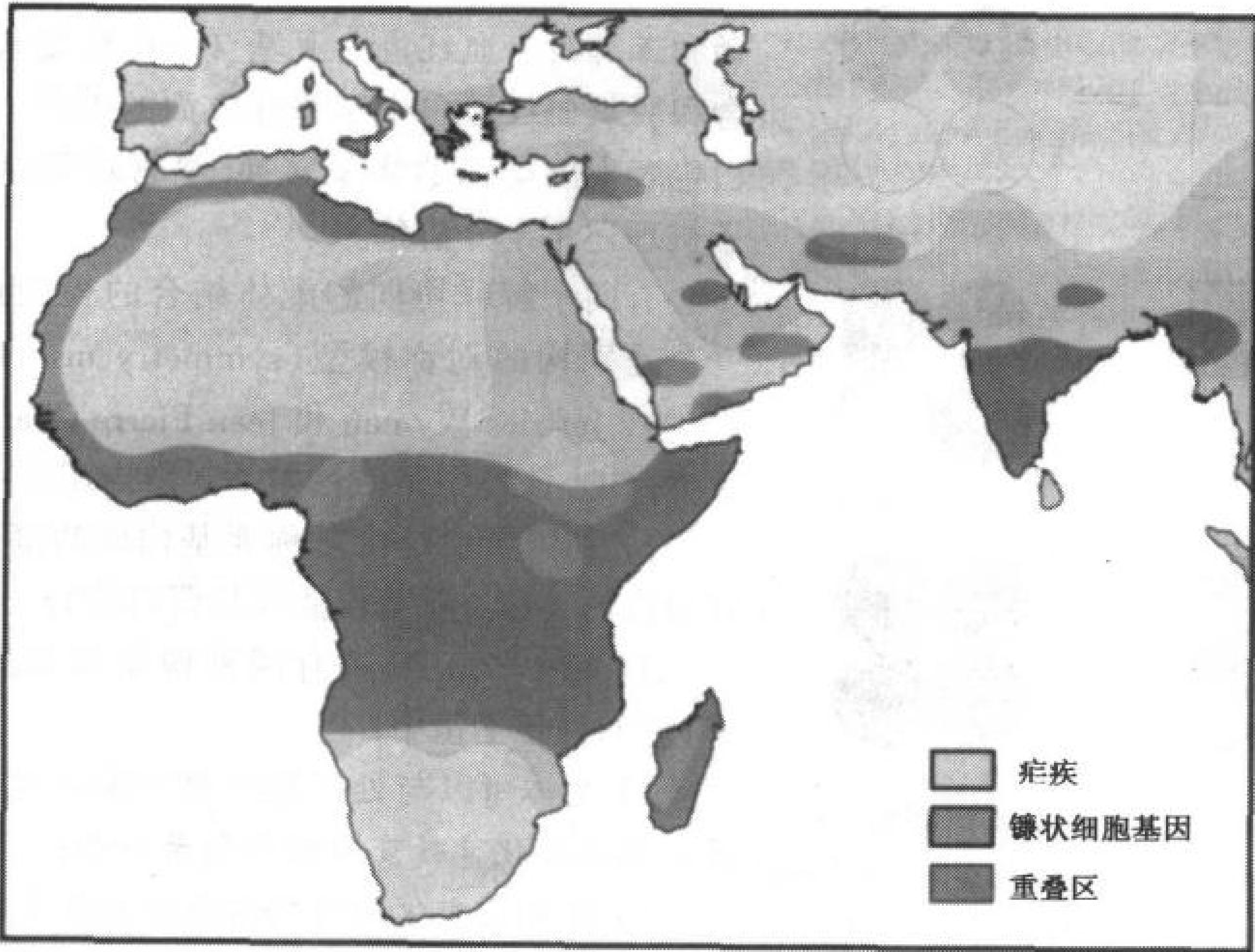


图 7-18　脱氧血红蛋白 S 纤维溢出破裂的红细胞的电镜图
(引自 Robert Josephs, University of Chicago)

框 7-3　健康和疾病的生物化学

疟疾和血红蛋白 S

疟疾是目前影响人类的最致命的传染性疾病。生活在疟疾流行区域的 25 亿人中,有 1 亿人患病,每年有 100 万死亡,其中多数为幼小的儿童。疟疾是由寄生于蚊子的疟原虫 *Plasmodium falciparum* 引起的,它在 48h 的生活史中多数时间寄生在红细胞中。感染后的红细胞黏附在毛细血管壁上,阻止血液流向维持生命的器官,从而导致死亡。



在赤道附近的非洲地区,疟疾是主要的死亡原因(地图的蓝色区域),同时也恰好是镰状细胞基因的流行区(红色区),表明镰状细胞基因对疟疾有抵抗作用。

它是怎样起作用的呢？疟原虫使感染后的红细胞的酸性增加了约 0.4 个 pH 单位，由 Bohr 效应可知，pH 的降低增加了脱氧血红蛋白的形成，这样增加了含有血红蛋白 S 的红细胞形成镰状的可能性。正常情况下，镰状损伤的红细胞会通过脾从循环中清除。在疟疾感染的早期，也许增强了寄生能力的镰状使得脾优先清除感染了的红细胞。在感染的后期，当含有寄生虫的红细胞黏附到细胞壁上后（大概是阻止脾把它们从循环中清除），也许形成镰状可使寄生虫机械破裂。因此在疟疾区血红蛋白 S 杂合携带者最有适应优势：他们比正常的血红蛋白的纯合个体更有望活到成年。这样在疟疾流行区，带有镰状细胞基因的杂合个体的比率会上升，直到他们的生存优势被相应增加的镰状细胞基因的纯合个体（在没有现代医疗的情况下，这些人会在幼年死亡）平衡为止。

179

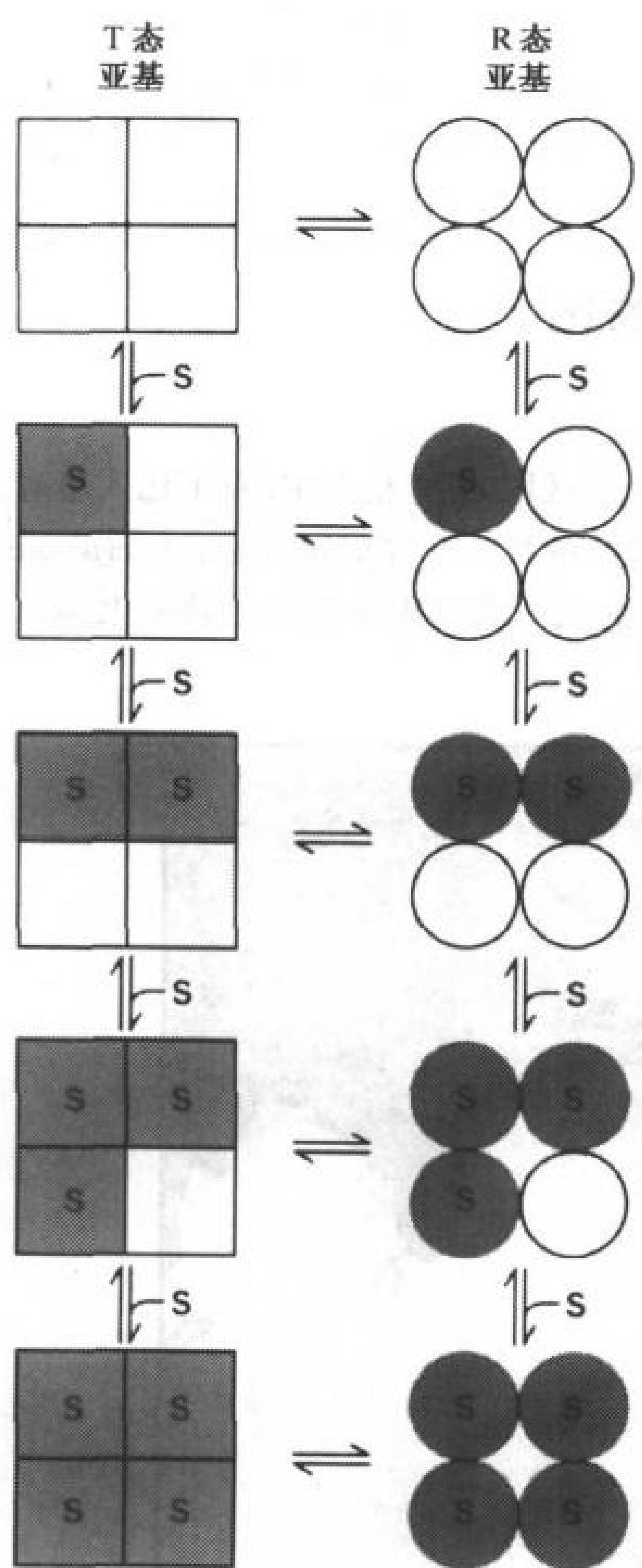


图 7-19　别构效应的对称模型

正方形与圆形分别代表一个四聚体蛋白的 T 态和 R 态亚基。无论与蛋白结合的配体数目（用 S 代表）多少，T 态和 R 态都处于平衡中。所有亚基都应当处于 T 态或 R 态；该模型不允许一个蛋白中同时出现 T 态或 R 态的亚基。

E. 别构蛋白

氧结合血红蛋白的协同性是说明许多其他结合小分子的多亚基蛋白（包括某些酶）的一类模型。在某些情况下，一个配体结合到蛋白的一个部位会增加处于同一个蛋白的其他结合部位的亲和性（就像氧结合血红蛋白那样）。而在另一些情况下，一个配体又会降低其他结合部位的亲和性（比如 BPG 与血红蛋白的结合可以降低血红蛋白与氧的亲和性）。以上这些现象都是**别构作用**（allosteric interaction）的结果。*别构效应，即一个配体与一个部位的结合会影响另一个配体与另一个部位的结合的现象，通常都需要寡聚蛋白亚基间的相互作用*。血红蛋白亚基 T→R 转化解释了氧在氧合和脱氧血红蛋白中亲和性方面的差异。其他一些蛋白也表现出类似的构象转换，尽管理解这些现象的分子机理还不十分清楚。

有两个解释协同的配体结合的模型最引人关注。一个是别构的**对称模型**（symmetry model），由 Jacques Monod、Jeffries Wyman 和 Jean-Pierre Changeux 于 1965 年提出的，该模型是通过如下规则描述的：

1) 别构蛋白是由对称亚基构成的寡聚体（尽管血红蛋白的 α 和 β 亚基仅能算是假对称）；

2) 每一个亚基都有两种构象状态，即 R 态和 T 态；它们处于平衡中；

3) 配体可以与处于任一种构象的亚基结合，*只有亚基构象变化才改变对配体的亲和性*；

4) *在构象变化期间仍然维持着分子的对称性*。因此亚基必须以协同的方式改变构象，换句话说，不存在同时含有 R 态和 T 态亚基的寡聚体。图 7-19 给出了以四聚体蛋白为例的对称模型示意图。如果一种配体

与R态的结合比其与T态的结合更紧密，那么这种结合会促使T→R的转换，因此增加了未结合配体的亚基对配体的亲和性。

对对称模型的一个主要疑问是很难使人相信在所有的蛋白中都存在寡聚体的对称性，也就是说，无论结合配体的数目多少，在所有亚基中都同时发生T→R的转换。另外对称模型只能解释正协同性，而有一些蛋白却表现出负协同性。

对称模型的一个替换模型是由Daniel Koshland提出的别构**序变模型**(sequential model)。按照该模型的说法，配体的结合诱导与其结合的亚基的构象变化，通过这种构象变化对相邻亚基的影响使得协同作用加强。随着更多配体结合部位被占据，这种构象变化依次发生(图7-20)。亚基对配体的亲和性随着其构象的变化而变化，可能比无配体结合的蛋白亚基高或低。所以遵循别构序变模型的蛋白可以是正协同性或负协同性的。

180

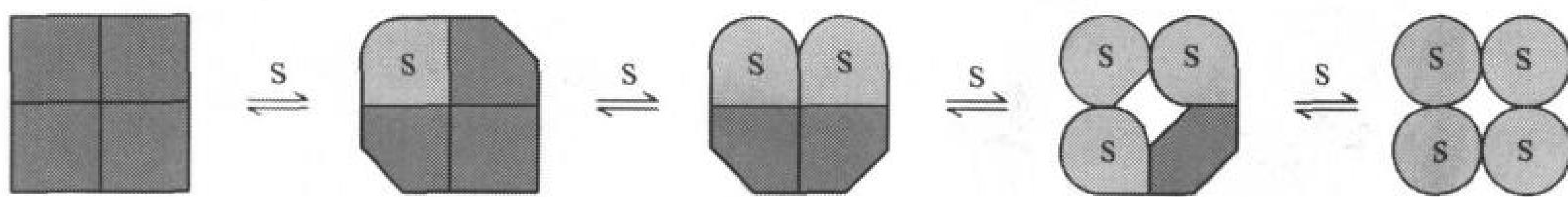


图7-20 别构效应的序变模型

配体的结合依次诱导亚基构象的变化，其中结合配体的亚基发生的构象变化最大。
在该过程中寡聚蛋白的对称性并没有像对称模型那样维持着。

如果序变模型中亚基间的机械偶联特别强，构象变化同时发生，寡聚体就像对称模型那样保持其对称性。因此别构对称模型可以认为是更具普遍性的序变模型的一个特例。

氧与血红蛋白的结合表现出两种模型的特性。四级结构的T→R转换就像对称模型所要求的那样是协同的，而配体与T态结合的确引起了三级结构的微小变化，就像序变模型所预测的那样。这些小的构象变化毫无疑问导致最终触发T→R转换的应力增加。因此可以认为血红蛋白和其他蛋白中配体-蛋白相互作用的复杂性使得结合过程可精细地调节，以适应体内和体外条件的变化。当我们在第12章讨论酶的时候还会遇到别构效应。

3. 肌球蛋白与肌动蛋白

生物体最吸引人的特征就是具有有组织运动的能力。这种现象发生在所有结构层次上，包括各种各样的矢量过程，例如细胞分裂中复制染色体的分离、鞭毛与纤毛的摆动、肌肉的收缩等。在本节中，我们讨论了解最为详尽的运动系统之一——**横纹肌**(striated muscle)中运动的结构与化学基础。

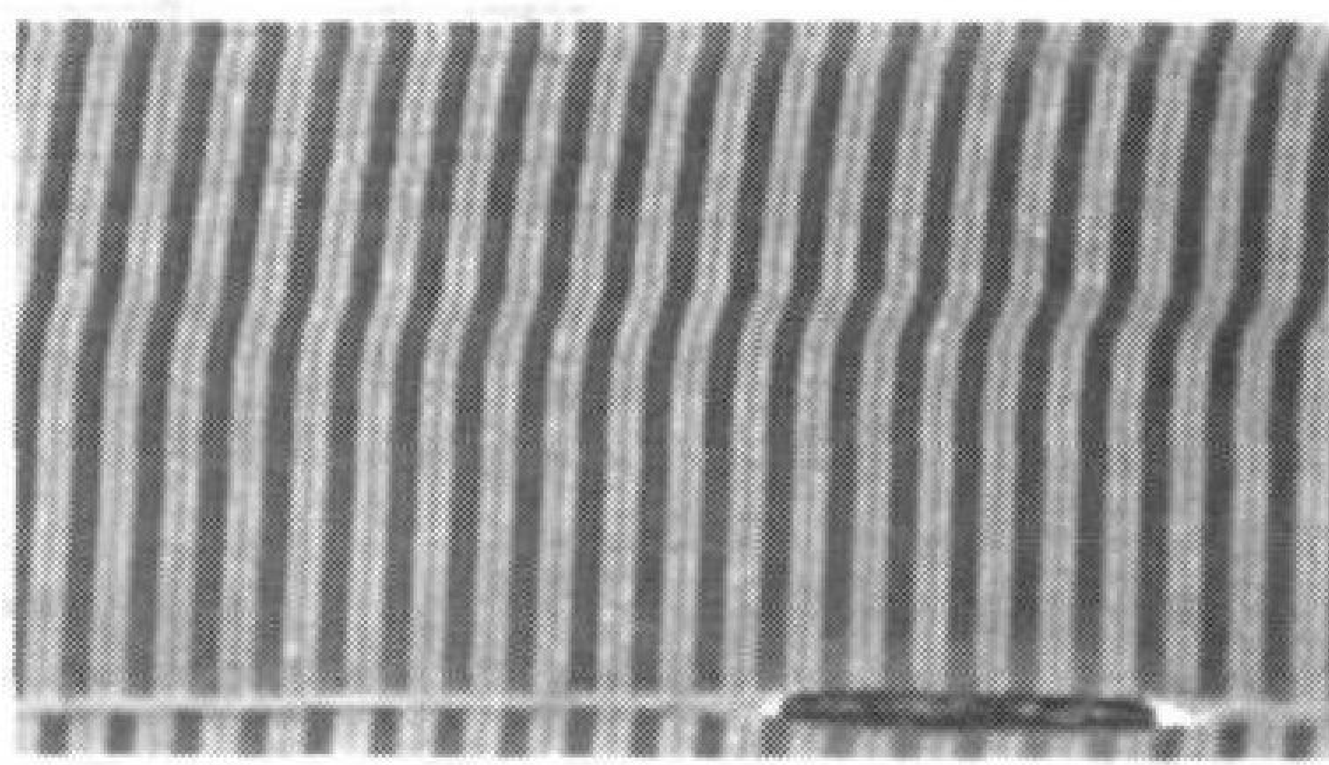


图7-21 肌纤维的显微相片

纤维的长轴为水平(垂直条纹)。肌原纤维中暗的A带与亮的I带交替图像清晰可见。(引自J.C. Revy, CNRI)

A. 横纹肌的结构

自由肌(包括骨骼肌)在光学显微镜下显示条纹状结构(图7-21)。这样的肌肉是由含有平行的**肌原纤维**(myofibril)(图7-22)束的长的多核细胞(肌肉

181

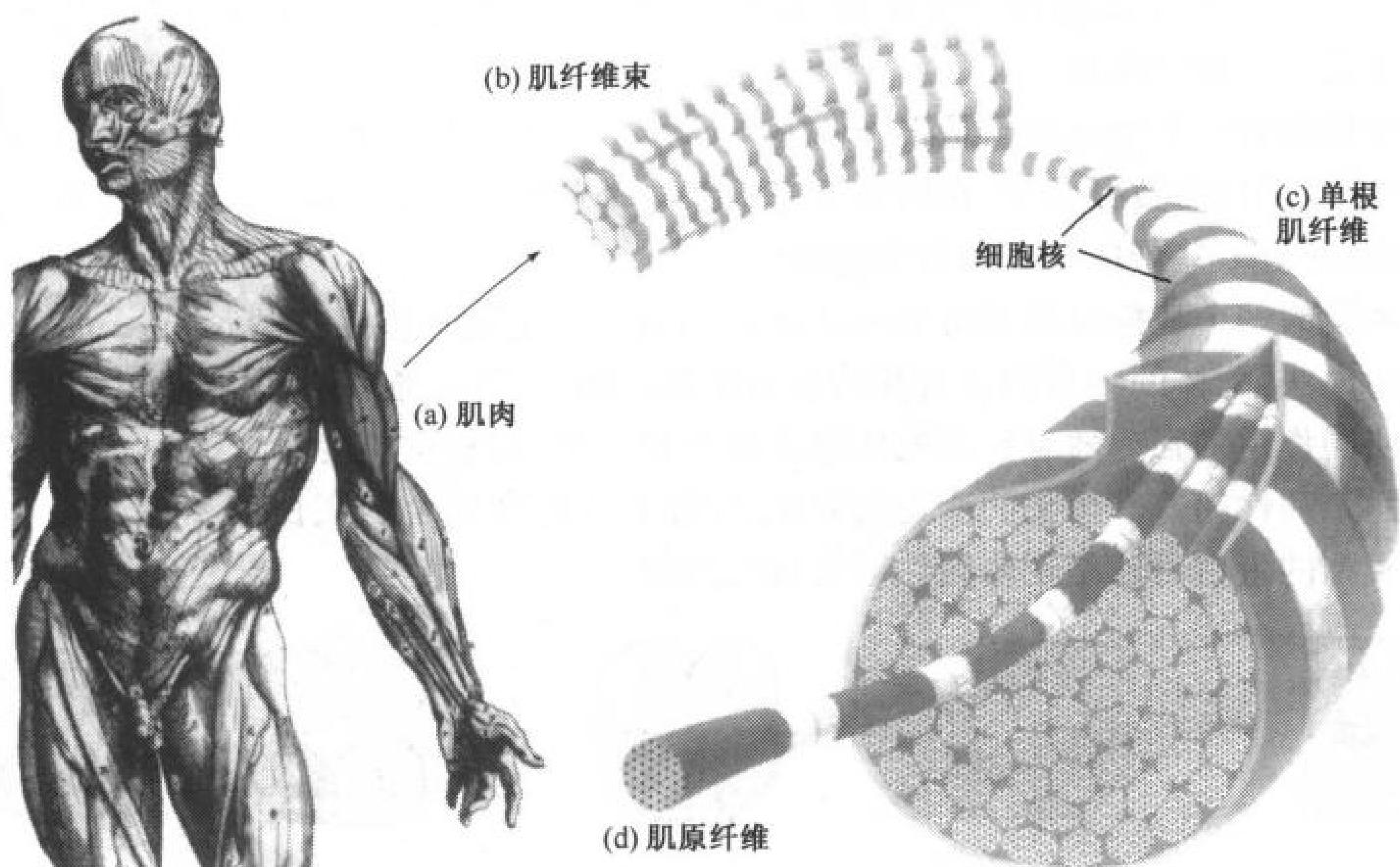


图 7-22 骨骼肌组织

肌肉(a)是由肌纤维束(b)组成的,每条肌纤维都是长而细的多核细胞(c),这种细胞与肌肉的长度相当。肌纤维含有成束的侧向排列的肌原纤维(d),肌原纤维又是由交替的成束的粗丝和细丝组成的。

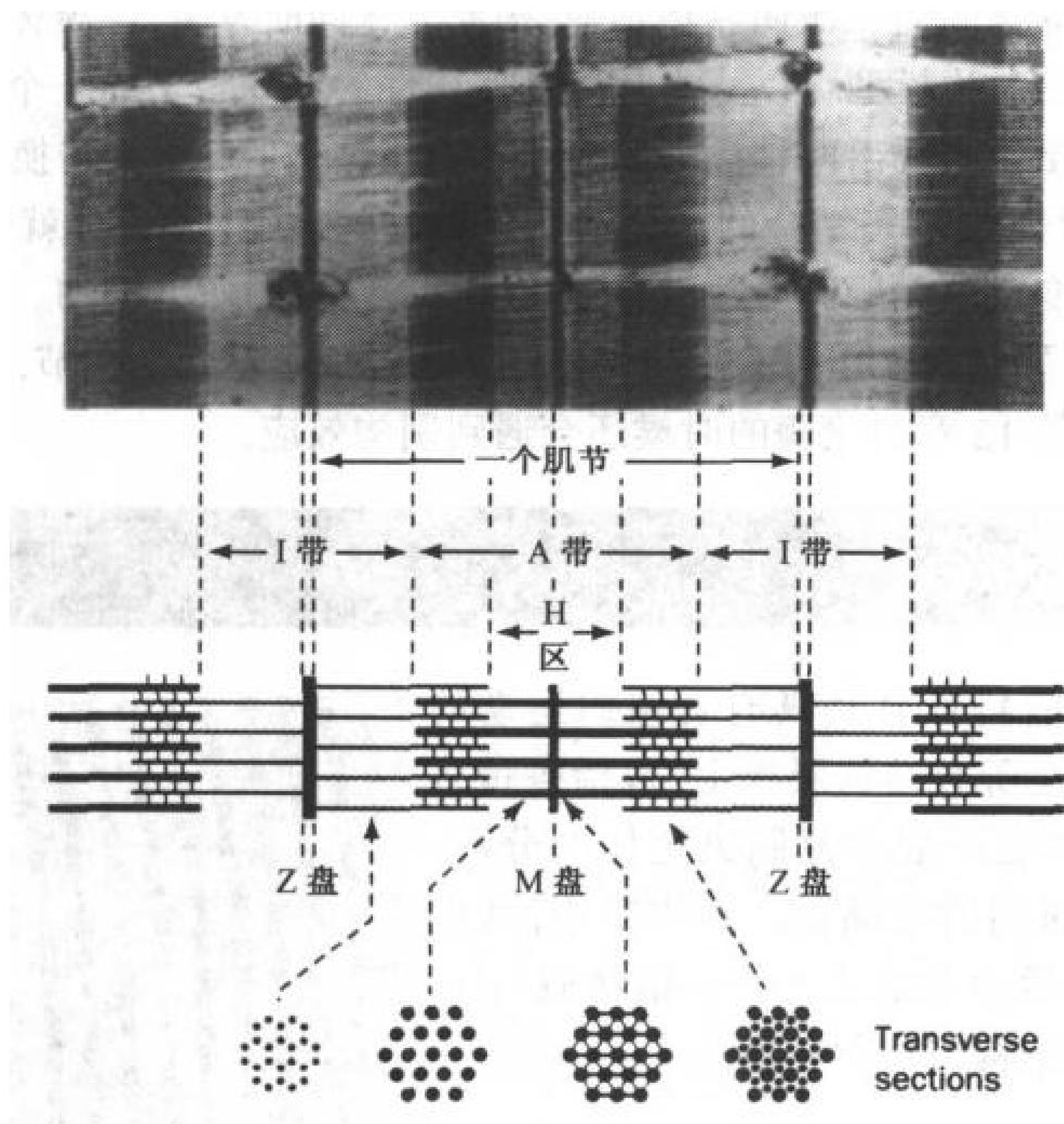


图 7-23 肌原纤维解剖

电子显微照相显示了三条肌原纤维的一部分,这三条纤维被水平的间隙分开。下方的示意图表示了肌原纤维的主要特征:亮带 I 只含有细丝;A 带,其暗区 H 只含有粗丝,而更黑的外部含有互相重叠的粗丝和细丝;Z 盘为细丝的锚定点;M 盘是由于每个粗丝的中心处的凸出形成的。肌原纤维的功能单位——肌节是两个连续 Z 盘之间的区域。(引自 Hugh Huxley, Brandeis University)

纤维)构成的。电子显微镜表明肌肉的条纹排列来自多肌原纤维的带状结构。这些带是由称为**A 带**与**I 带**的最大和最小的交替的电子密度区形成的(图 7-23)。肌原纤维的重复单元——肌节通过处于每个 I 带中心的 **Z 盘**捆扎在一起。A 带的中心区是 **H 区**,而 H 区的中心为 **M 盘**。A 带含有直径 150Å 的**粗丝**(thick filament),I 带含有直径 70Å 的**细丝**(thin filament)。两套丝通过互相重叠的肌横桥相连。

收缩的肌肉可以只有其充分伸展长度的三分之一长。收缩是由于肌节长度的缩短,是由 I 带与 H 区长度的缩短引起的(图 7-24a)。这种现象可以用纤丝滑动模型解释,在这种模型中交错互插的粗丝与细丝彼此滑动。

182

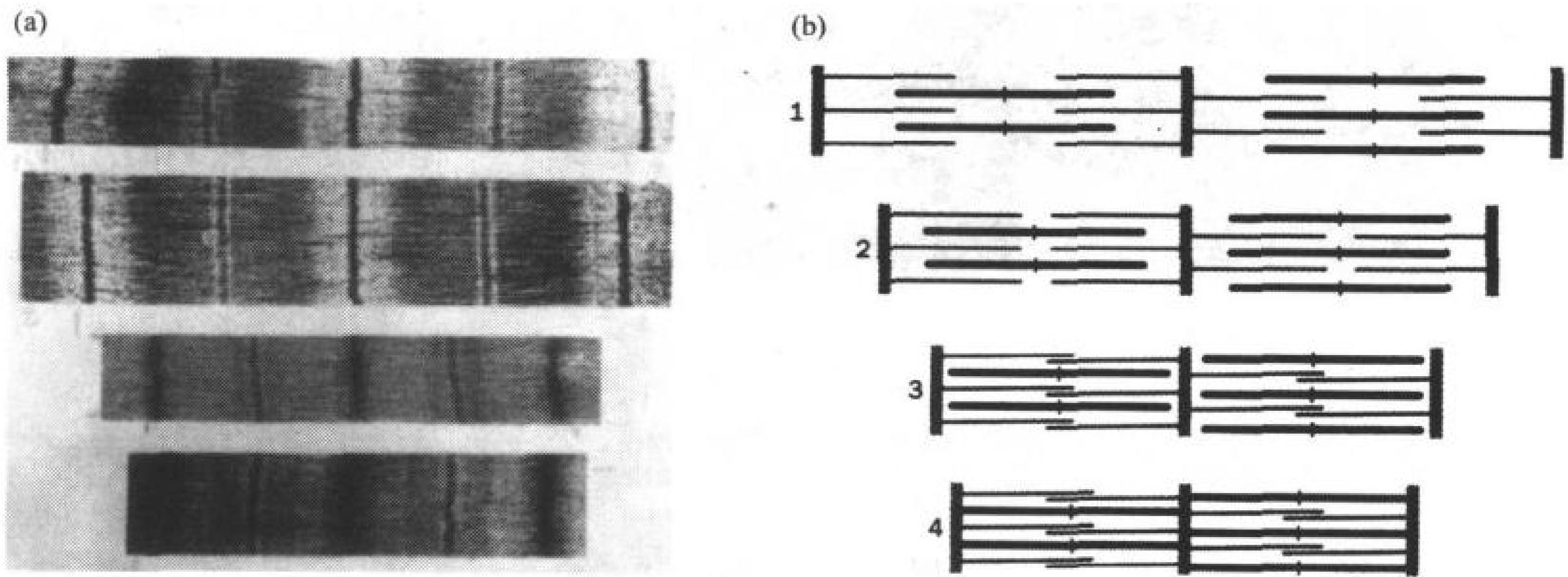


图 7-24　肌原纤维的收缩

(a)电子显微照相显示处于逐渐收缩的肌原纤维。当收缩时,I 带和 H 区的长度变短,而粗丝与细丝的长度不变。(b)示意图表明互相穿插的粗丝与细丝间的相互滑动。(引自 Hugh Huxley, Brandeis University)

B. 粗丝与细丝的结构

脊椎动物的粗丝几乎是由一个完整的单一类型的蛋白质——**肌球蛋白**(myosin)组成的,这种蛋白是由 6 个多肽链组成:2 个 220kDa **重链**(heavy chain)和 2 对不同的**轻链**(light chain),即所谓的**必需轻链**(ELC)的和**调节轻链**(RLC),其分子质量大小在 15～22kDa 之间,取决于其来源。如图 7-25 所示,N 末端的每条重链的一半形成了一个拉长的球形头部(55Å×165Å),这部分与每个 ELC 和 RLC 的一个亚基结合。该重链的 C 末端有一半形成了长纤维状的 α-螺旋尾部,两个这样的尾部结合形成左手螺旋。因此,肌球蛋白是由一段 1600Å 长的带有两个球状头部的片段构成的。肌球蛋白 α-螺旋尾部的氨基酸序列具有像出现在角蛋白中的那样的螺旋特征(节 6-1C):含有一个 7 残基序列的假重复序列,a-b-c-d-e-f-g,其

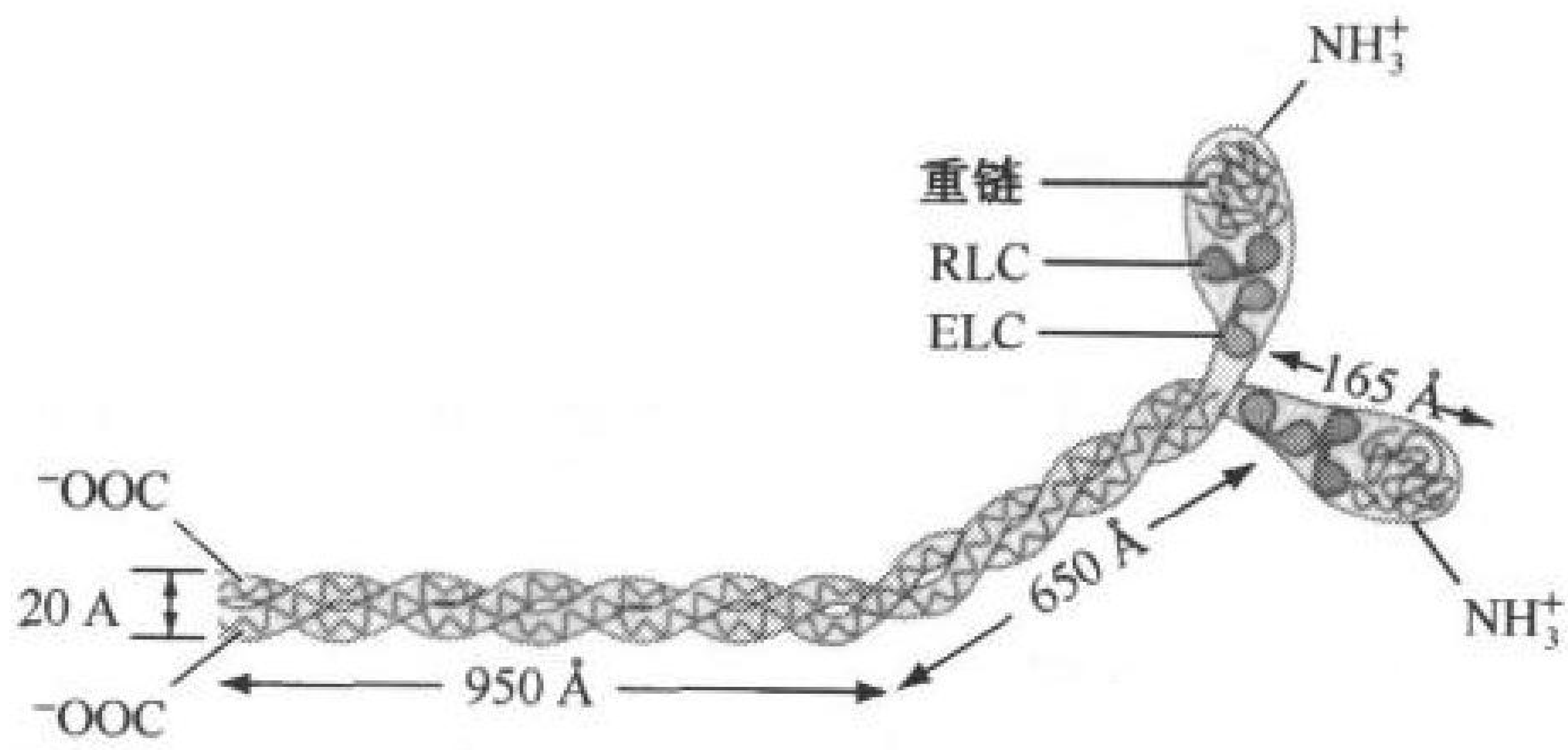


图 7-25　肌球蛋白分子

它含有两个相同的肌球蛋白重链(绿色与橙色),重链含有 N 端球形头部和 α-螺旋尾部。每个头部与一个必需的轻链(粉红色)和一个调节轻链(蓝色)结合。尾部互相缠绕形成一个 1600Å 长的平行的螺旋。

中在 a 和 d 位置主要是非极性残基。

183 在生理条件下，几百个肌球蛋白分子聚集形成粗丝，棒状尾部按照有规则的交错排列方式尾对尾包装，球状头部突出在两端的侧面(图 7-26)。这些肌球蛋白头部在完整的肌原纤维中与细链形成横桥。肌球蛋白头部是一种 **ATP 酶**(ATP 水解酶)，在其 13Å 深的 V 形袋中存在 ATP 结合部位。

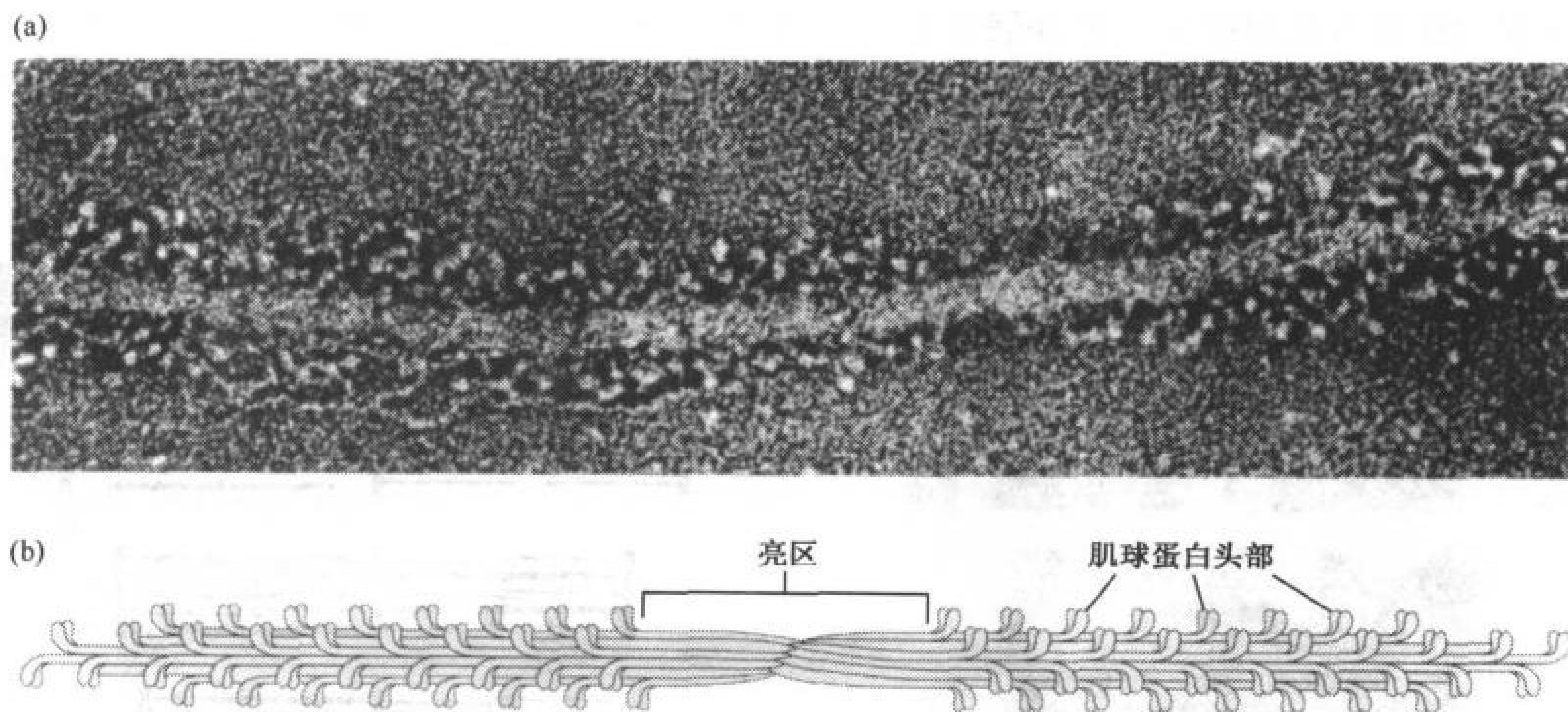


图 7-26 粗丝的结构

(a)电子显微照相表明肌球蛋白头部从粗丝中突出来。[引自 Trinick, J. and Elliott, A., J. Mol. Biol, 131, 135(1997)](b)粗丝示意图：几百个肌球蛋白分子交错排列，其球形头部从粗丝中伸出。

细丝由肌动蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白三种蛋白组成，它们如图 7-27 所示那样结合在一起。**肌动蛋白**(actin)是一个由 375 个残基构成的 bilobal 球蛋白，在细丝中心聚合形成纤维。**原肌球蛋白**(tropomyosin)是一个两条 α 螺旋形成的螺旋。这个长 400Å 的分子以头对尾方式与其他原肌球蛋白相连形成一条缆绳，该缆绳在肌动蛋白的螺旋沟内盘绕，使得每个原肌球蛋白与 7 个肌动蛋白单体接触。每一个原肌球蛋白分子与一个单一的异三聚体的**肌钙蛋白**(troponin)联结，肌钙蛋白结合 Ca^{2+}。

184 每一个肌动蛋白单体可与一个肌球蛋白头部结合(图 7-28)，可能是通过离子配对和通过每个蛋白上的疏水部分结合的。原肌球蛋白-肌钙蛋白复合物通过控制粗丝上肌球蛋白头部接近处于细丝的肌动蛋白上的结合部位来控制肌肉的收缩。

肌球蛋白与肌动蛋白总共占据肌肉总蛋白的 60%～95%。其他蛋白形成 Z 盘和 M 盘，组织粗丝与细丝排列。

C. 肌肉收缩的机制

要利用丝(粗丝和细丝)滑动模型解释肌肉收缩，每个通向肌动蛋白的肌球蛋白横桥(cross-bridge)本身必须在沿着朝向 Z 盘的细丝前方的新位点重复地脱开和再附着。实际的收缩力是由 ATP 水解提供的。Edwin Taylaor 提出了肌球蛋白催化 ATP 水解的模型，该模型经 Ivan Rayment、Hazel Hold 和 Ronald Milligan 的结构研究变得更为合理。模型要点如下(图 7-29)：

1) ATP 以一种引起肌动蛋白结合部位打开的方式结合肌球蛋白，而肌球蛋白释放结合的肌

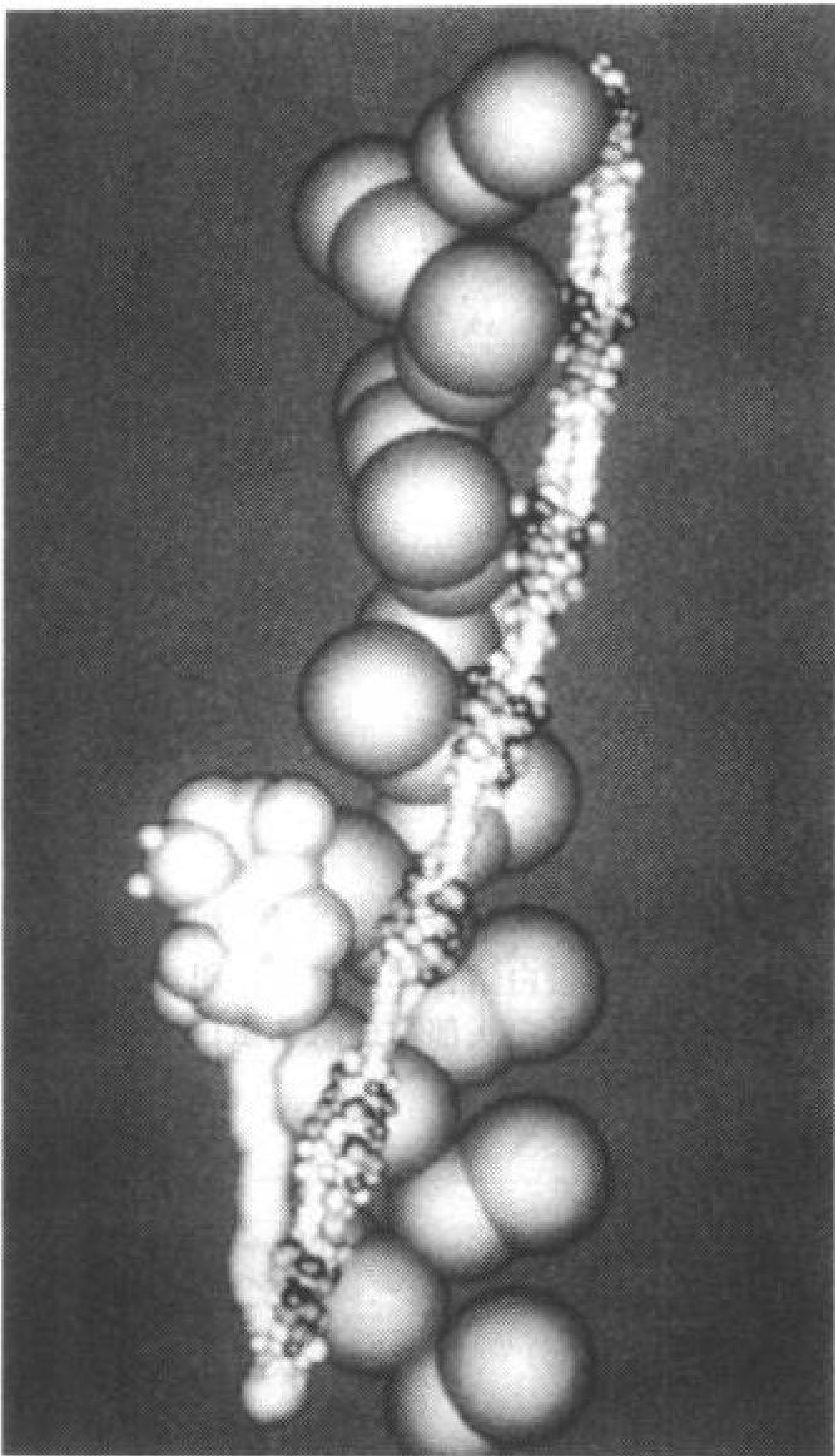


图 7-27　细丝结构

这个模型基于肌动蛋白的电子显微照相和原肌球蛋白的 X 射线衍射晶体结构给出。肌动蛋白(大的蓝色球)聚合形成细丝的核心。由两条 α 螺旋链的平行卷曲形成原肌球蛋白,缠绕在螺旋肌动蛋白纤维的沟内,使得每个原肌球蛋白与 7 个相连的肌动蛋白单体相连(图中只显示一个原肌球蛋白分子)。7 个红色和蓝色的区域被认为是 7 个与其相连的肌动蛋白单体。每一个原肌球蛋白分子与一个肌钙蛋白分子相连(大的白色球和茎)。小的蓝色球体代表结合的 Ca^{2+}。为清楚起见,在肌动蛋白丝背面缠绕的原肌球蛋白被省略掉了。(引自 George N. Philips, Jr., Rice University)

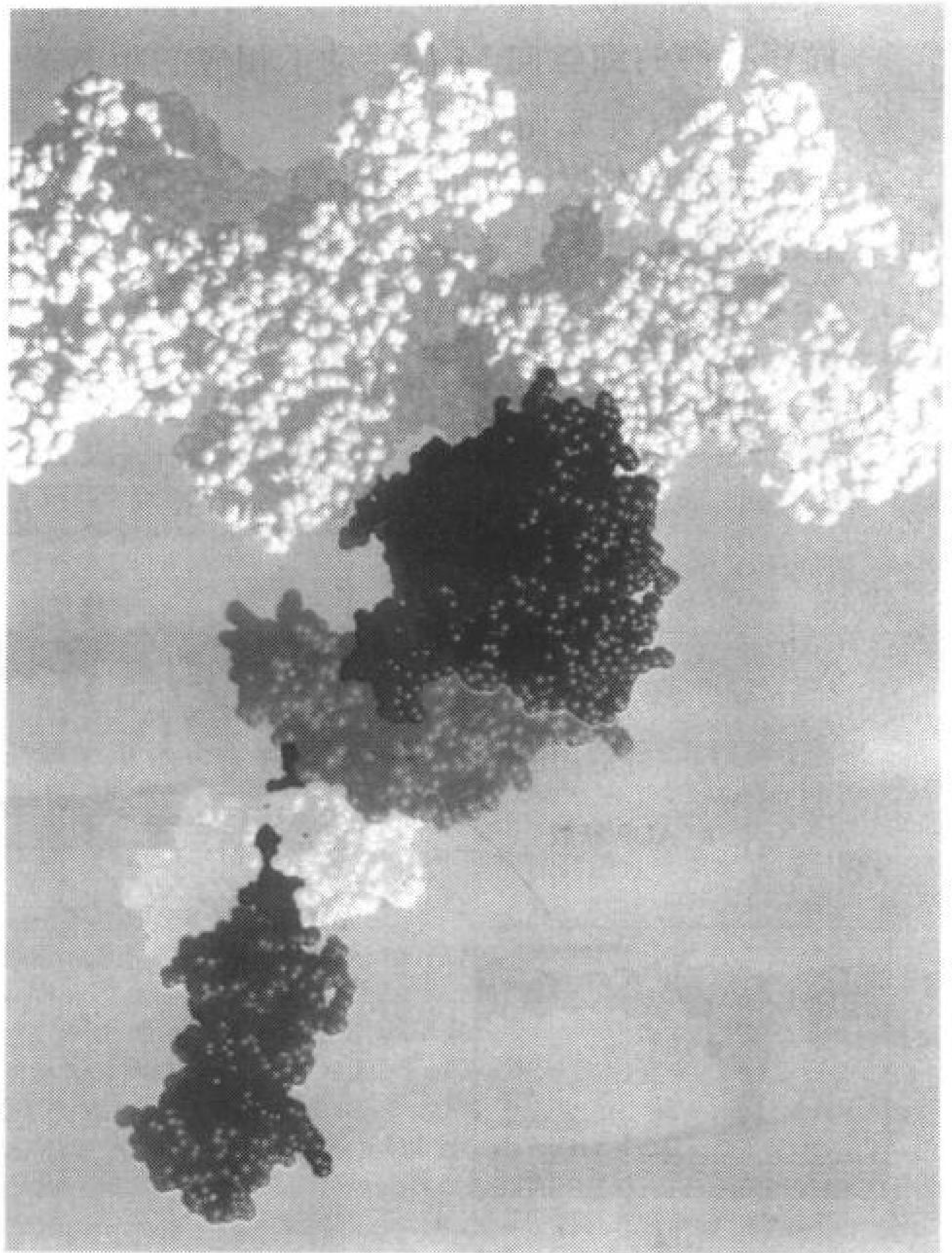


图 7-28　肌球蛋白与肌动蛋白相互作用模型

该空间填充模型是通过肌球蛋白与肌动蛋白的晶体结构及其复合物的电镜照片建立的。肌动蛋白丝在上部,肌球蛋白头部(带有 ELC 黄色和 RLC 紫色的亮色的结构)以约 45°角方向与肌动蛋白聚合物接触。肌球蛋白螺旋尾部没有给出。ATP 结合部位位于肌球蛋白头部红色结构域裂隙中。在肌原纤维中每一个肌动蛋白单体都有可能结合肌球蛋白头部,而粗丝含有许多伸向外面的肌球蛋白头部。(引自 Ivan Rayment and Hazel Holden, University of Wisconsin)

动蛋白。

2) 围绕在 ATP 周围的活性部位闭合。ATP 水解造成肌球蛋白头部“抬起”,将其置于一种“高能”的大致与粗丝垂直的构象。

185

3) 肌球蛋白头部与靠近 Z 盘的肌动蛋白单体微弱结合,该单体比肌球蛋白先前结合的肌动蛋白更靠近 Z 盘。

4) 肌球蛋白释放磷酸,引起构象转换,该转换增加了肌球蛋白对肌动蛋白的亲和性。

5) 紧随着能量驱动立即导致瞬间状态的形成,一种更进一步的构象转换,这种转换使得肌

186

球蛋白头部的 C 端尾部相对于其头部的肌动蛋白结合部位的 Z 盘快速移动大约 60Å，从而将接触的细丝向 M 盘移动了相应的距离。

6）释放 ADP，完成循环。

在一次剧烈肌肉收缩期间，处于每个粗丝的大约 500 个肌球蛋白头部通过此系列反应每秒非同步循环 5 次。因此肌球蛋白头部伴随着肌肉收缩沿着邻近朝向 Z 盘的细丝“散步”或“划动”。

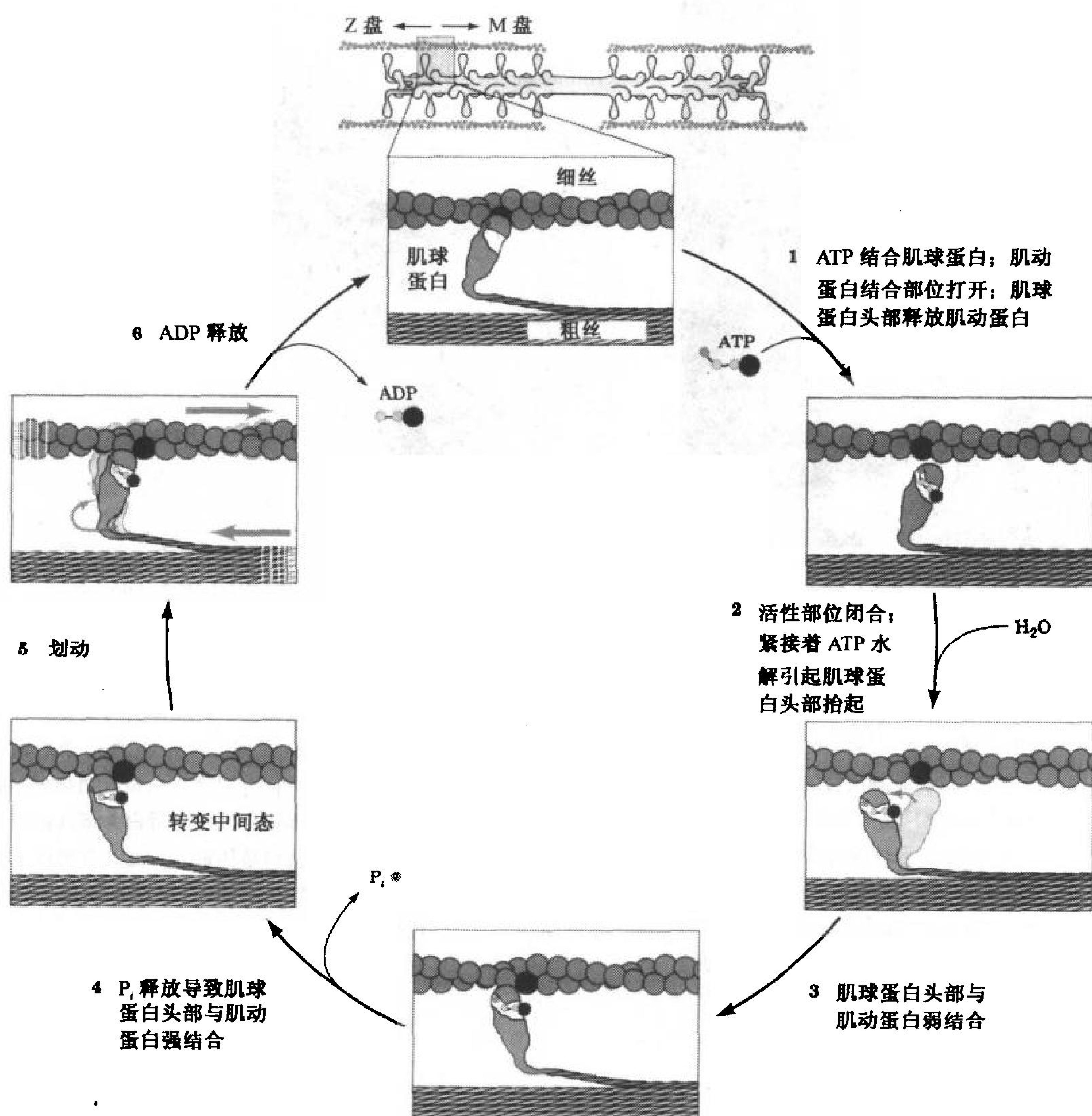


图 7-29 功能的秘诀：肌肉中力量产生机制

肌球蛋白的头部在肌动蛋白细丝上向前“走”，是向着一个方向的循环过程，该过程是由 ATP 水解成 ADP 和 P_i 产生的能量驱动的。本图中只显示一个肌球蛋白头部，为了区别起见，在循环开始肌球蛋白头部结合的肌动蛋白单体被画为深色。

肌肉收缩的控制

天然肌肉只有在 Ca^{2+} 存在情况下才收缩，但高度纯化的肌动蛋白与肌球蛋白无论 Ca^{2+} 浓度高低都能收缩。完整肌肉内对钙离子敏感的是**肌钙蛋白 C**(troponin C)(图 7-30)，肌钙蛋白 C 是细丝蛋白肌钙蛋白的一个亚基(节 7-3B)。肌原纤维被一个神经脉冲刺激会导致 Ca^{2+} 从肌质网(由内质网衍生的扁平囊泡系统)上释放，结果导致细胞内的 Ca^{2+} 浓度从 $10^{-7}mol \cdot L^{-1}$ 提高到 $10^{-5}mol \cdot L^{-1}$。在较高浓度下，过剩的 Ca^{2+} 与肌钙蛋白 C 结合，引起肌钙蛋白-原肌球蛋白复合物构象的变化。这种变化使肌球蛋白头部结合肌动蛋白的结合部位暴露。当肌原纤维 $[Ca^{2+}]$ 低时(Ca^{2+} 被 ATP 驱动的蛋白泵特异地从肌原纤维中泵出)，肌钙蛋白-原肌球蛋白复合物维持其原有构象不变，阻止肌球蛋白结合肌动蛋白并导致肌肉松弛。

D. 非肌肉细胞中的肌动蛋白

尽管肌动蛋白和肌球蛋白在肌肉中最丰富，但它们也出现在其他组织中。事实上，肌动蛋白分布广泛，而且通常是真核细胞中最为丰富的胞质蛋白，典型的占细胞总蛋白的 5%～10%。

非肌肉肌动蛋白形成 70Å 直径纤维，通常称为**微丝**(microfilament)，可以通过**荧光显微镜**观察(使用荧光标记的抗体使它结合的肌动蛋白"染色"，图 7-31)。微丝与其他蛋白纤维共同构成细胞骨架。将肌动蛋白的单体组装进纤维中需要 ATP。通常肌动蛋白亚基的结合与解离是处于一种动态平衡中的。**踏车**(treadmilling)就是指尽管纤维的长度保持不变，但可发生一个肌动蛋白亚基从纤维一端除去，再从另一端加上的现象。这种肌动蛋白丝的装配与解离是一些细胞过程的基础，比如变形虫运动、胞质分裂(细胞分裂中子代细胞的分离)、细胞质流动和

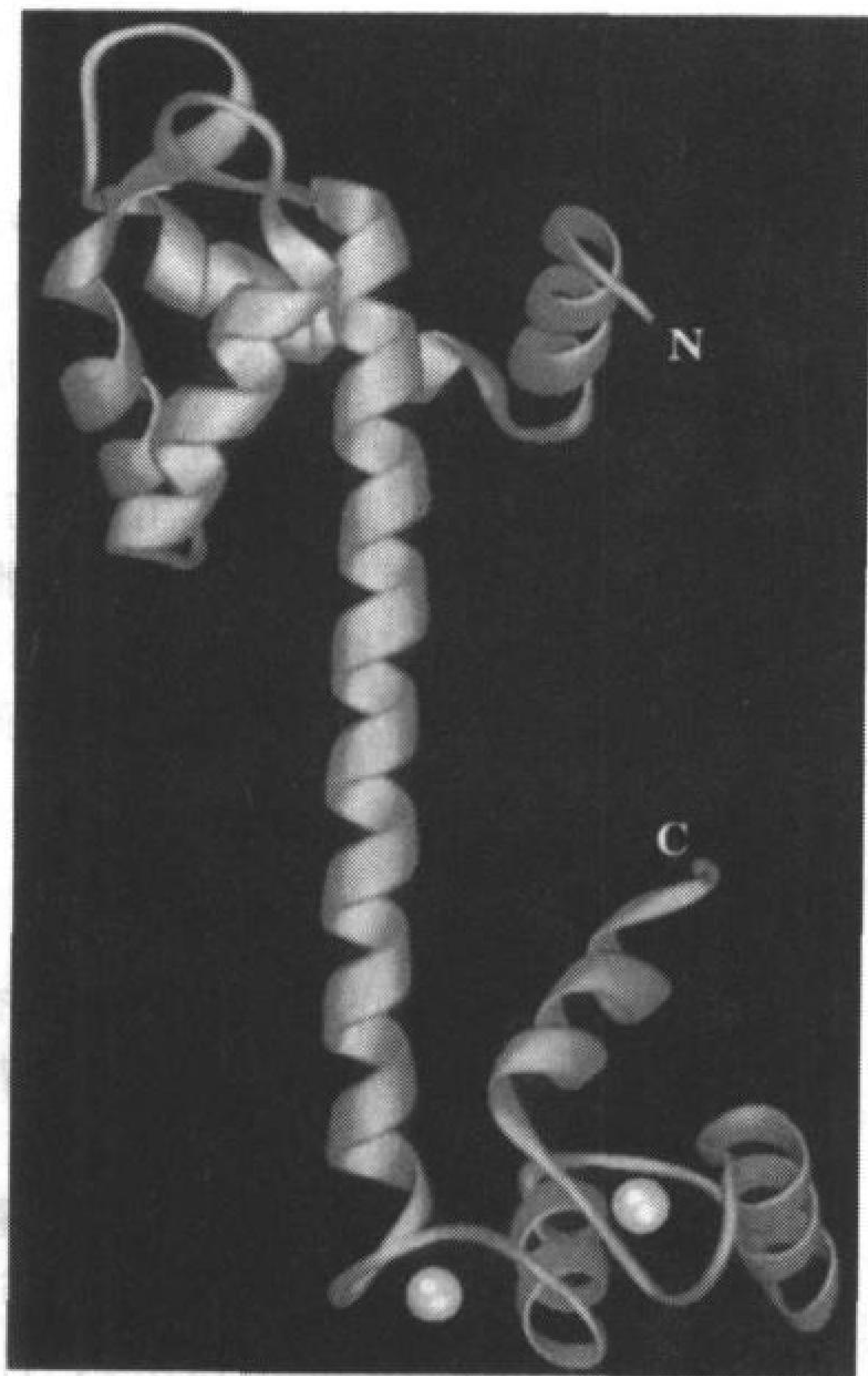


图 7-30　鸡肌肉肌钙蛋白 C 的 X 射线结构图
两个结构相似的球形结构域通过一条 9 转的螺旋连接，每个球形结构域都能结合两个 Ca^{2+}。在细胞内 Ca^{2+} 浓度低时，两个 Ca^{2+} 依然结合；在高 Ca^{2+} 浓度下，过剩的 Ca^{2+} 与上面的结构域结合。(引自 Muttaiya Sundaralingam, University of wisconsin)

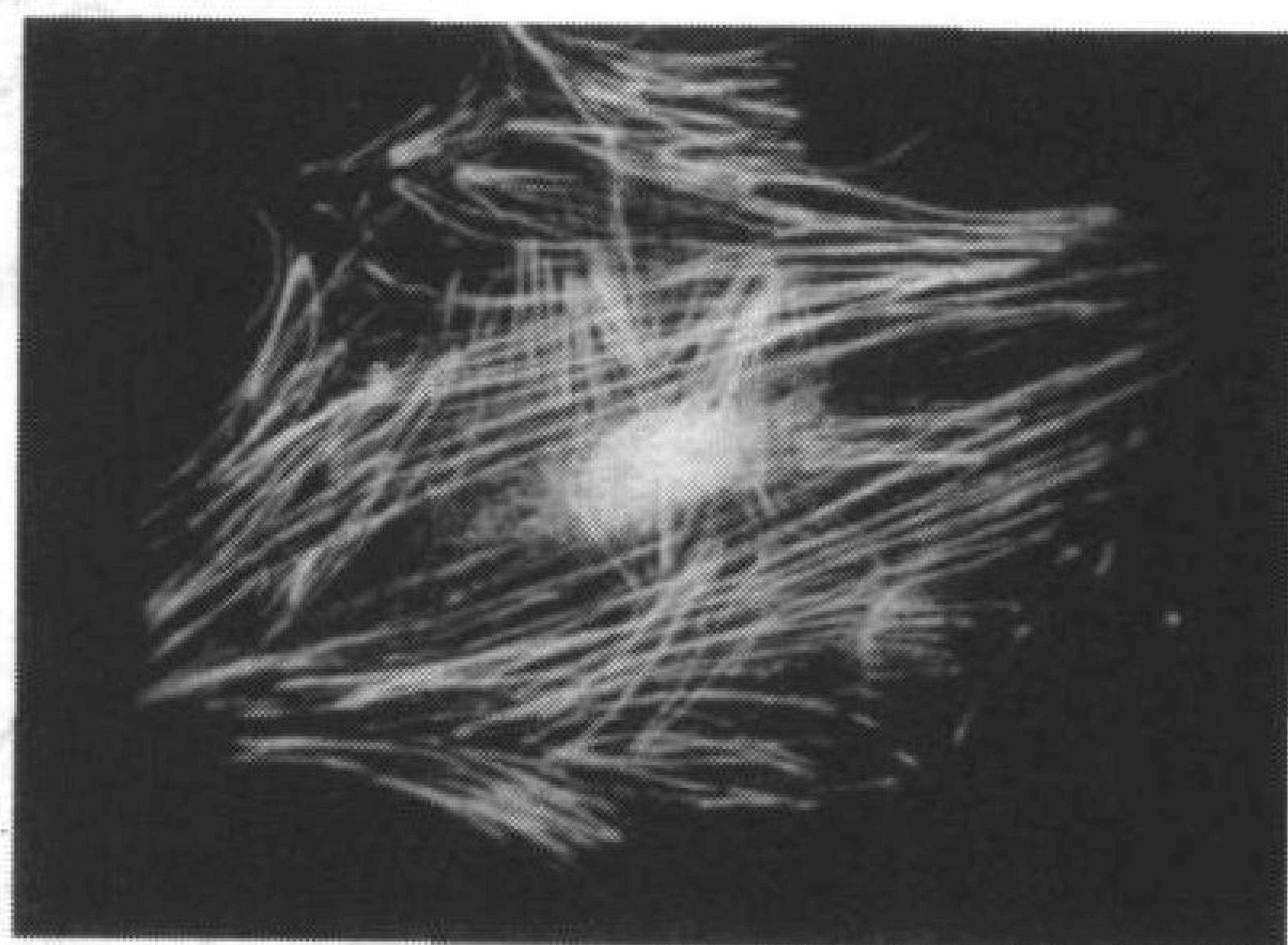


图 7-31　肌动蛋白微丝
利用荧光标记的肌动蛋白抗体可以看到位于培养皿表面的成纤维细胞的微丝。当细胞开始移动时，微丝散开形成分散的网状。(引自 Elias Lazarides, Tanabe Research Laboratories, Inc.)

各种不同细胞突出部的伸展与收缩。

4. 抗体

所有的有机体都会不断地受到其他有机体的攻击，包括引起疾病的微生物和病毒的攻击。在高等动物中这些**病原体**可以破坏由皮肤和黏膜等形成的物理屏障(第一道防线)，但当它被**免疫系统**(immune system)认定为外来入侵者后即被消灭。

187

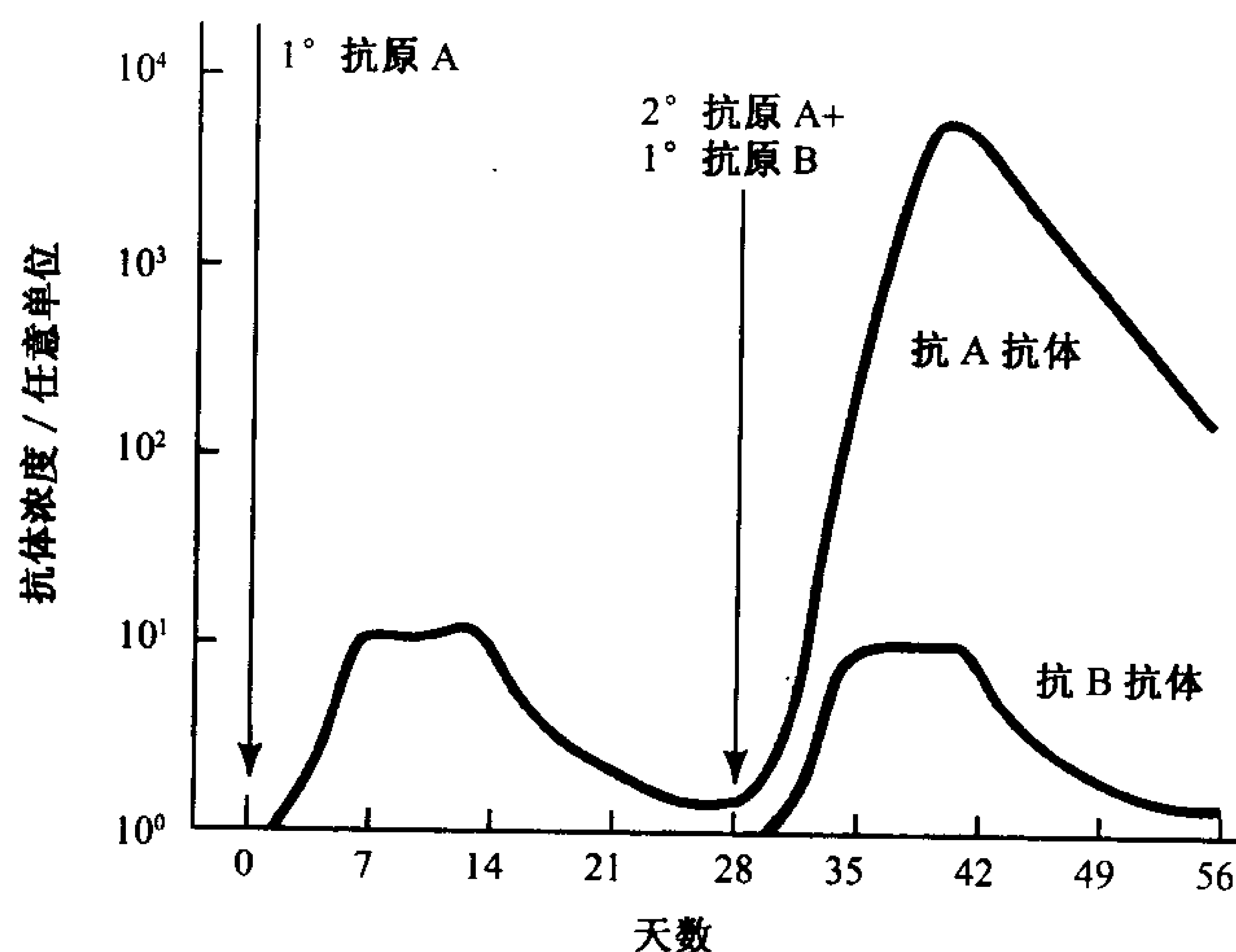
A. 免疫系统概述

存在两种类型的免疫：

1) **细胞免疫**，它抵抗病毒侵染细胞、真菌、寄生虫和外周组织。细胞免疫是通过 **T 淋巴细胞**或称 **T 细胞**实现的，所以这样称呼是由于它们的发育过程是在胸腺中完成的。
2) **体液免疫**，在抵抗细菌感染和细胞外病毒感染方面最为有效。它是通过相关蛋白[常称为**抗体**(antibody)或**免疫球蛋白**(immunoglobulin)]的巨大的不同组合实现的。抗体是由 **B 淋巴细胞**或称 **B 细胞**产生的，在哺乳动物中 B 细胞是在骨髓中成熟的。

下面将重点介绍抗体的结构与功能。

免疫响应是由外源大分子的出现触发的，这些大分子通常是指蛋白质或是碳水化合物，常称为抗原(antigen)。*B* 细胞的免疫球蛋白位于其表面。如果 *B* 细胞遇到了可与其表面特异免疫球蛋白结合的抗原，它就吞入这种抗原-抗体复合物并降解它，然后在其细胞表面显示出该抗原片段。而后 *T* 细胞刺激 *B* 细胞增殖，大多数 *B* 细胞后代是循环细胞，它分泌大量抗原特异性抗体。这些抗体可以和更多的抗原分子结合，并标记这些抗原以使免疫系统的其他成员消灭它们。尽管如果没有相应抗原刺激，大多数 *B* 细胞只能存活几天，但少数能够长久生存的**记忆 B 细胞**却能够在几周甚至是几年之后识别其相应抗原，并引起比还没有遇到其相应抗原的 *B* 细胞更快速、强烈的免疫响应(称为二次响应)(图 7-32)。



188

图 7-32 第一次和第二次免疫响应

抗原 A 的抗体出现在血液中是在第一次免疫的第 0 天和第 28 天的第二次免疫。抗原 B 在第二次免疫时加入证明对抗原 A 免疫记忆的特异性。对抗原 A 的第二次响应比第一次响应更快又更剧烈。

B. 抗体结构

免疫球蛋白是一组即互相联系又具有巨大多样性的蛋白。所有的免疫球蛋白都至少含有 4 个亚基：两条相同的约 23kDa 的**轻链**(L)和两条相同的 53～75kDa 的**重链**(H)。这些亚基通过二硫键和非共价连接形成一个类似于 Y 形的对称分子，可以用$(LH)_2$表示(图 7-33)。

5 类不同的免疫球蛋白(**Ig**)家族的区别在于它们含有的重链的种类不同，有些情况下它们的亚基结构也不同(表 7-2)。例如，**IgM** 是由 5 个排列在一个中心 **J 亚基**周围的 Y 形分子组成的；**IgA** 可以以单

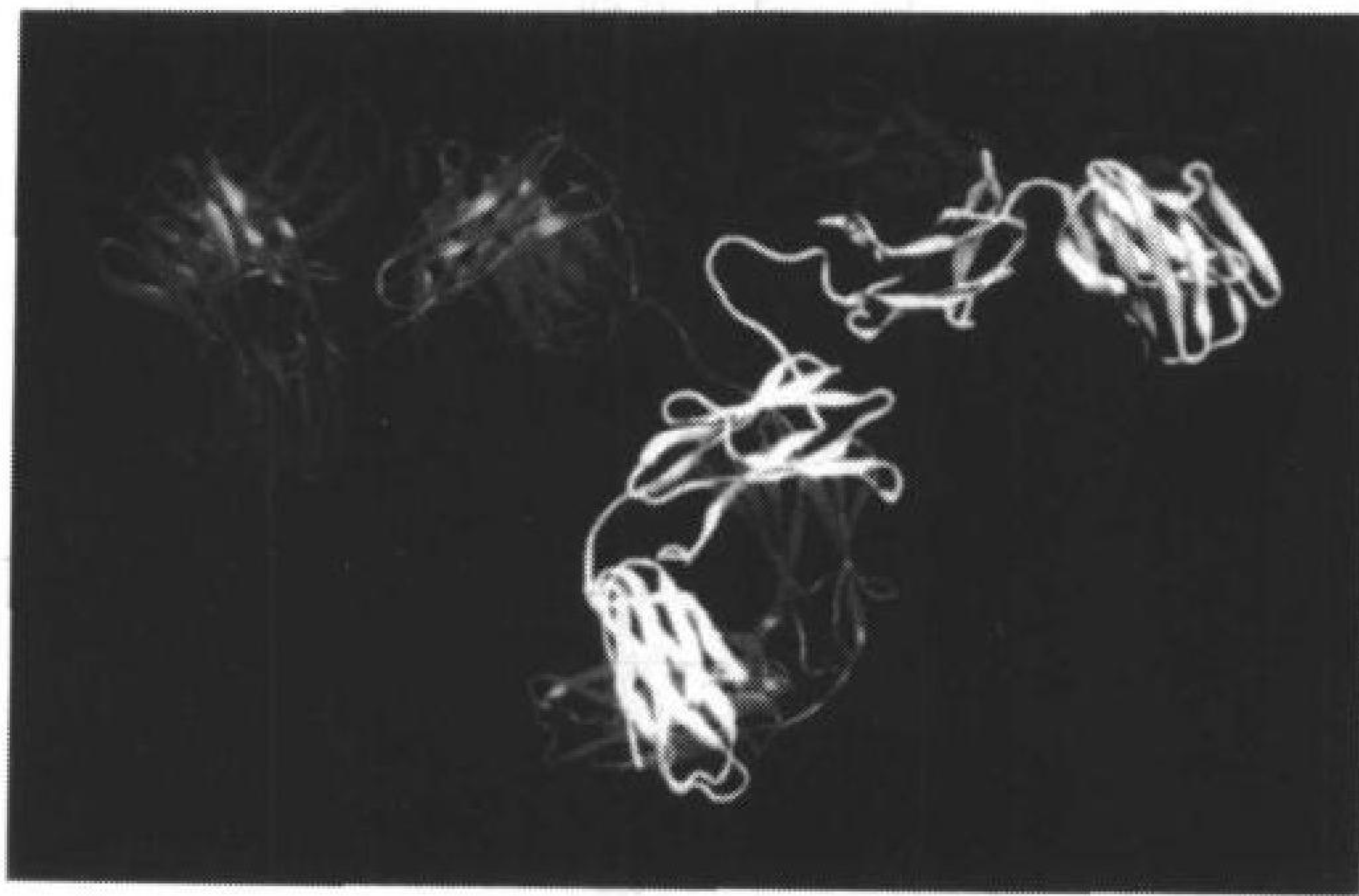


图 7-33 鼠抗体的 X 衍射晶体结构

重链为黄色和蓝色,轻链都是红色。抗原结合部位位于 Y 形分子臂的末端。

(引自 Alexander McPherson, University of California at Riverside)

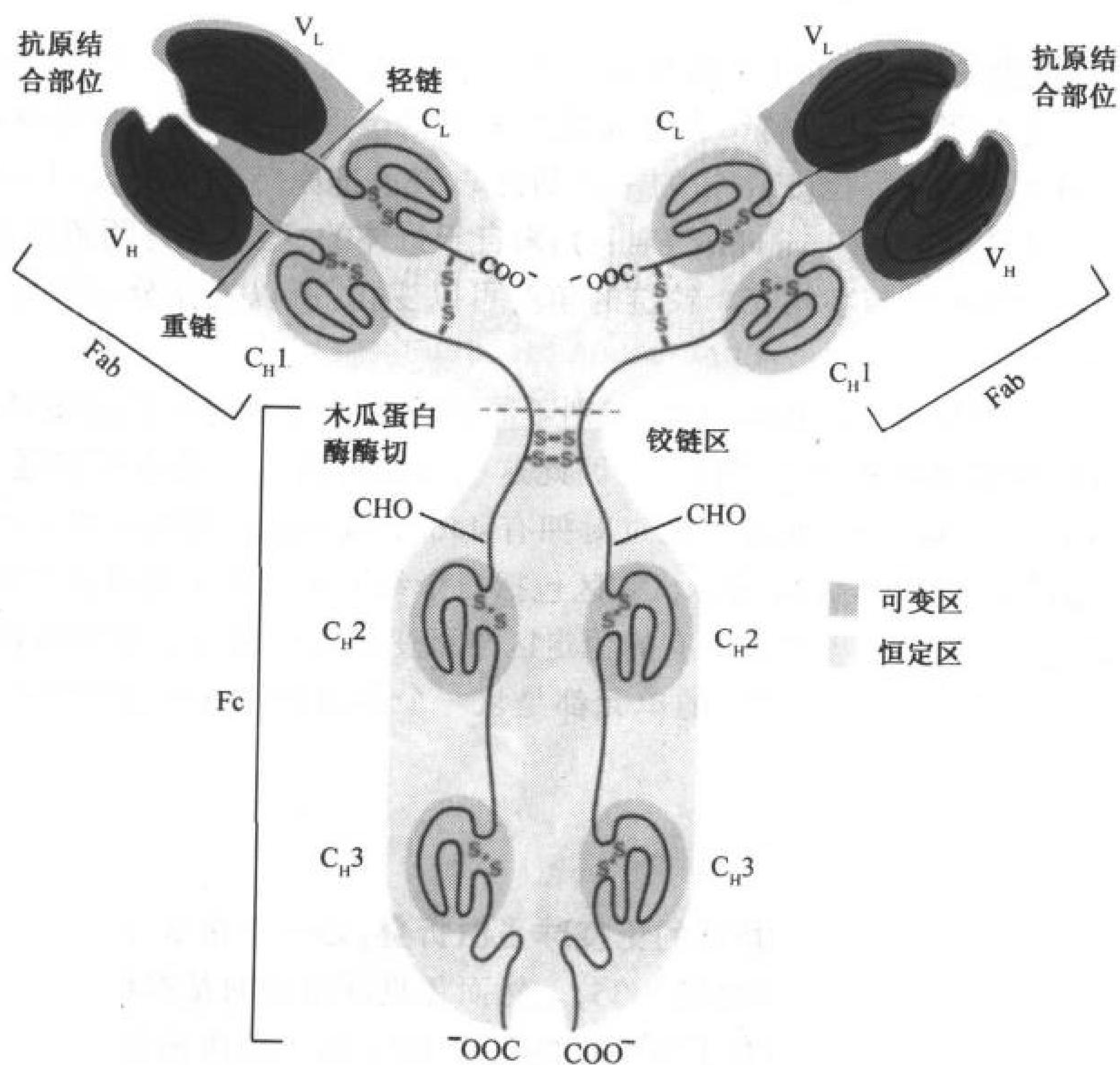


图 7-34 结构的秘诀:人免疫球蛋白 G(IgG)示意图

每条轻链都含有可变区(V_L)与恒定区(C_L),每条重链有一个可变区(V_H)和三个恒定区(C_H1、C_H2 和 C_H3),每一个可变和恒定结构域都含有二硫键,并且这四条链之间也靠二硫键连接。木瓜蛋白酶在铰链区切开 IgG 产生两个 Fab 片段和一个 Fc 片段。CHO 代表糖链。(引自 Irving Geis)

体、二聚体或是三聚体的形式出现。不同类的免疫球蛋白也具有不同的生理功能。IgM 是对微生物最为有效的并且是响应抗原时第一个被分泌的抗体。**IgG** 是最普遍的免疫球蛋白，并均匀地分布于血液和血管外液中。IgA 主要出现在肠道中，并通过附着在病原体的抗原部位阻止其与上皮表面的结合，抵御侵入的病原体。**IgE** 通常在血液中的含量极少，保护机体免受寄生虫的攻击并与过敏反应有关。**IgD** 含量同样很小，其功能还不清楚。我们主要讨论 IgG 的结构。

表 7-2

名称	重链	轻链	亚基结构	分子质量/kDa
IgA	α	κ 或 λ	$(\alpha_2\kappa_2)_nJ^a$ 或 $(\sigma_2\lambda_2)_nJ^a$	360～720
IgD	δ	κ 或 λ	$\delta_2\kappa_2$ 或 $\delta_2\lambda_2$	160
IgE	ε	κ 或 λ	$\varepsilon_2\kappa_2$ 或 $\varepsilon_2\lambda_2$	190
IgG[b]	γ	κ 或 λ	$\gamma_2\kappa_2$ 或 $\gamma_2\lambda_2$	150
IgM	μ	κ 或 λ	$(\mu_2\kappa_2)_5J$ 或 $(\mu_2\lambda_2)_5J$	950

[a] $n = 1, 2,$ 或 3。

[b] IgG 含有 4 种亚型：IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，其 γ 链不同。

IgG 可以被**木瓜蛋白酶**(papain)有限水解成 3 个 50kDa 左右的片段：两个 **Fab** 片段和一个 **Fc** 片段。Fab 片段是 Y 形抗体的“臂”，含有完整的 L 链和一半 H 链的 N 端部分(图 7-34)。这些片段含有 IgG 的抗原结合部位[Fab 中的“ab”的意思表示抗原结合(antigen binding)]。Fc 部分[“c”表示这个片段易于结晶(crystallize easily)]来自于抗体的“茎”，含有两条重链的 C 端部分。Y 的臂通过一个柔性铰链区与茎相连。铰链的角度可以变化，所以抗体分子可能不是完全对称的(图 7-33)。

189

尽管所有 IgG 分子有相同的整体结构，识别不同抗原的 IgG 却有不同的氨基酸序列。不同抗体轻链之间的区别主要存在于 N 端部分，因此这些多肽可以认为是由**可变区** V_L(1～108 残基)和**恒定区** C_L(109～204 残基)组成。通过对拥有 446 个残基的重链的比较表明，重链同样有可变区 V_H 与恒定区 C_H。如图 7-34 所示，C_H 区包括三个约 110 个残基组成的片段——C_H1、C_H2 和 C_H3，这些片段与 C_L 相似。事实上所有的恒定区与可变区在序列与二硫键结合方式方面都相似。这些相似性表明，IgG 这六个相似的单元都是从一个编码约 110 个残基蛋白的原始基因复制引申而来的。

C. 抗原-抗体结合

免疫球蛋白相似单元拥有同样特征的**免疫球蛋白折叠**：是一个由 3 个或 4 个通过二硫键连接的反向平行 β 折叠的“三明治”结构(图 7-35)。然而免疫球蛋白的基本结构必须适应抗原的巨大多变性。识别不同抗原的能力存在于可变区的三个 loop 里。抗体内的大多数氨基酸可变性集中在这三个称为**高变**(hypervariable)序列的短片段内。正如 Elvin Kabat 假设的那样，高变序列使免疫球蛋白的抗原结合部位排成一列，以便它的氨基酸序列决定其结合的特异性。

科学家已经测定了来自大量的**单克隆抗体**(monoclonal antibody)的 Fab 片段的 X 射线结构(见框 7-4)和从**多发性骨髓瘤**(multiple myeloma)病人分离出的单一特异性抗体(多发性骨髓瘤：一种癌变的 *B* 细胞增生并产生大量的单一免疫球蛋白的疾病；从正常血液中分离纯化的免疫球

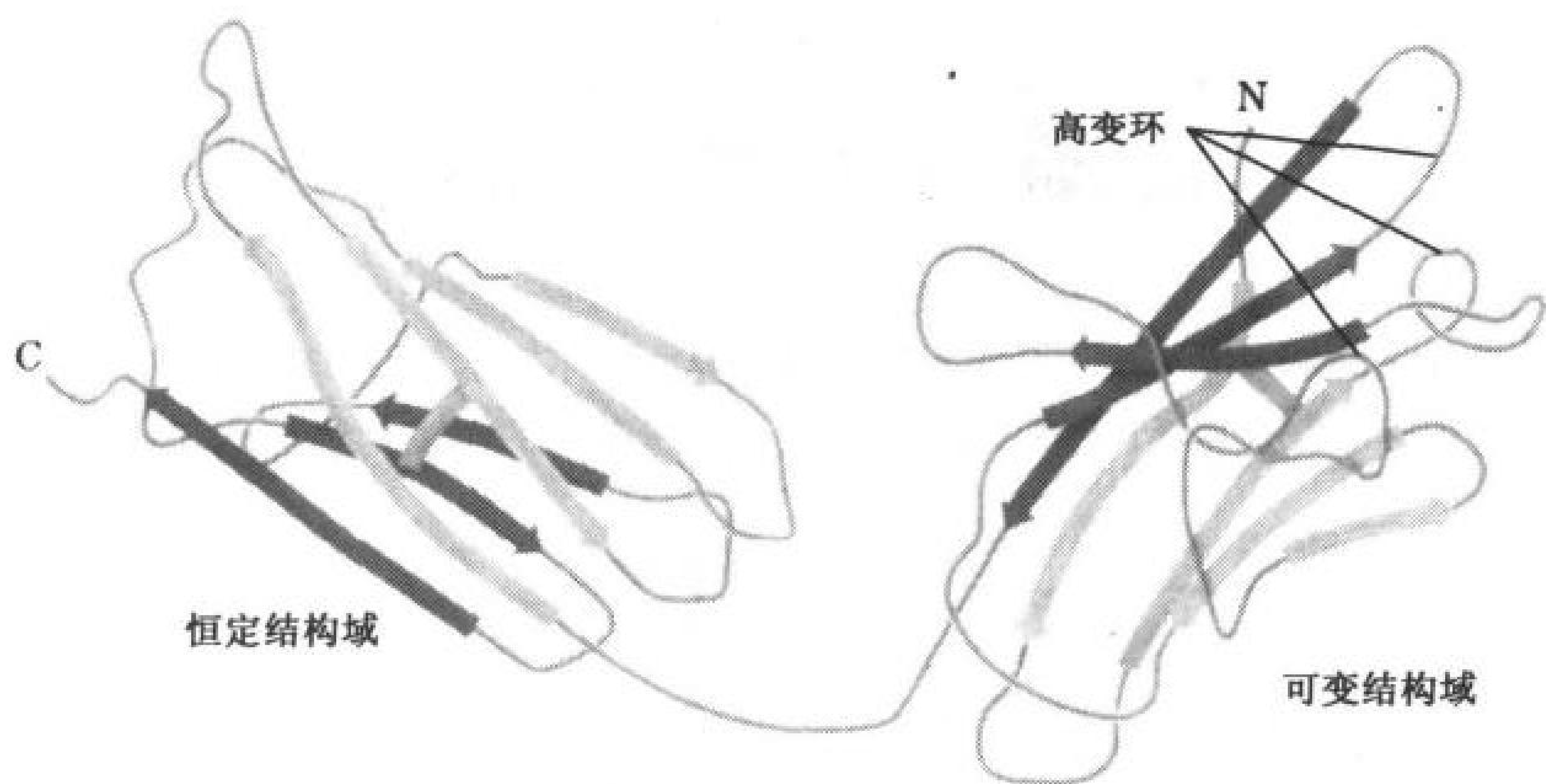


图 7-35　免疫球蛋白轻链的折叠

恒定和可变结构域是由 4 条反向平行的 β 折叠(蓝色)和 3 条反向平行的 β 折叠(桔红色)组成的三明治结构，两组折叠片是通过二硫键(黄色)连接的。图中给出了在可变区中的三个高可变序列。[引自 Schiffer, M., Girling, R.L., Ely, K.R., and Edmundson A.B., Biochemistry 12, 4628(1973)]

蛋白不是均一的,因此不能用来进行详细的结构研究)。从高变序列的位置可以看出,抗原结合部位位于每一个 Fab 片段顶端的 V_L 与 V_H 结构域之间的缝隙内。

190

抗体与其相应抗原的结合涉及到范德华力、疏水作用、氢键和离子间相互作用。它们的解离常数的范围从 $10^{-10} \sim 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$,与酶和底物结合的强度相当(或更强些)。抗原-抗体复合物的特异性与强度是抗原与抗体间精确结构互补的函数(图 7-36)。这些也是抗体成为实验室中一种有用试剂的原因(见图 5-3)。

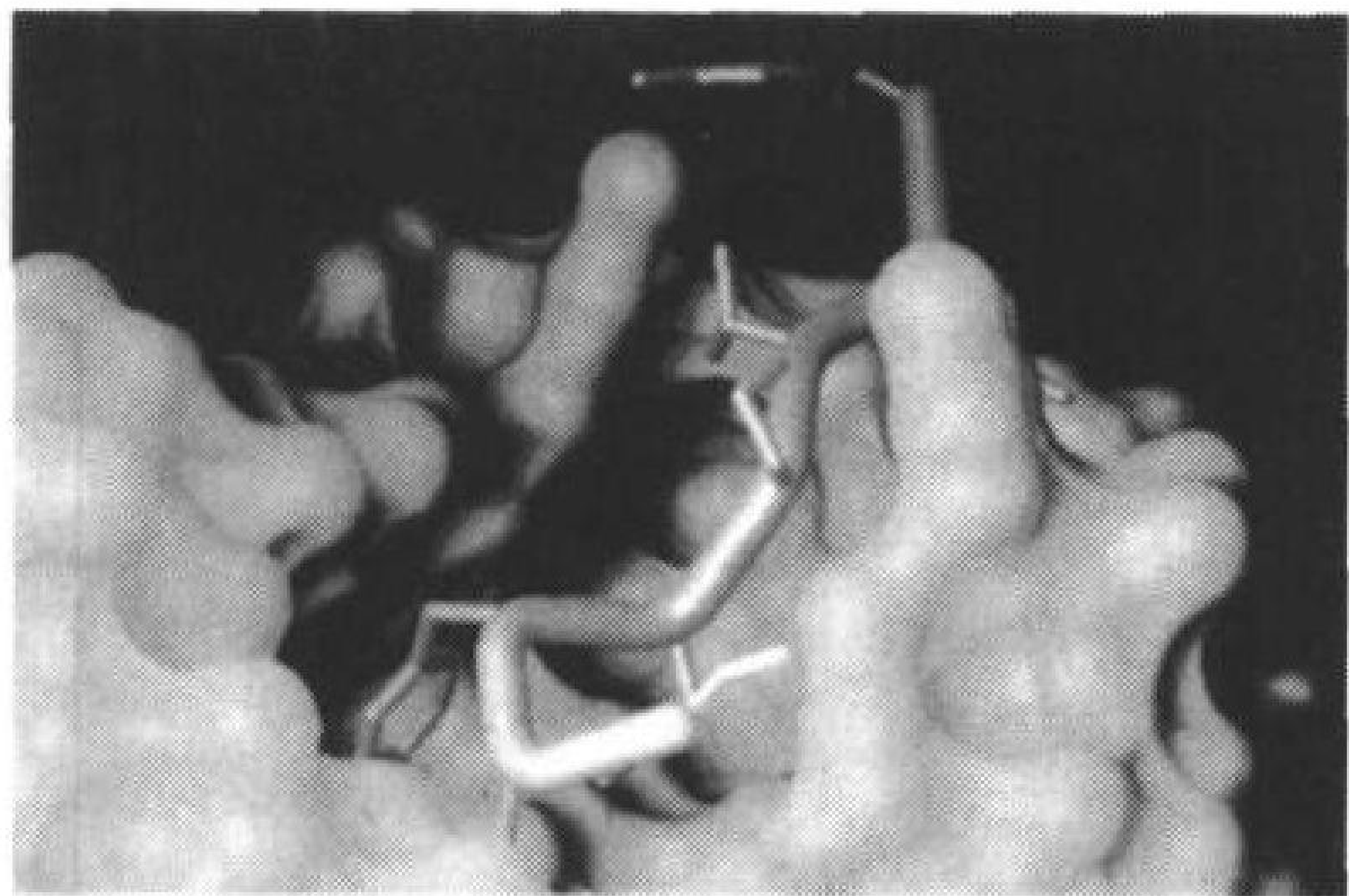


图 7-36　抗原抗体间的相互作用

X 射线结构显示单克隆抗体 Fab 片段(绿色)的溶剂可及表面部分与它的肽抗原(蓝色)的 9 个残基片段的棒状模型的相互作用状况。(引自 Ianwilson, The Scripps Research Institute, La Jolla, California)

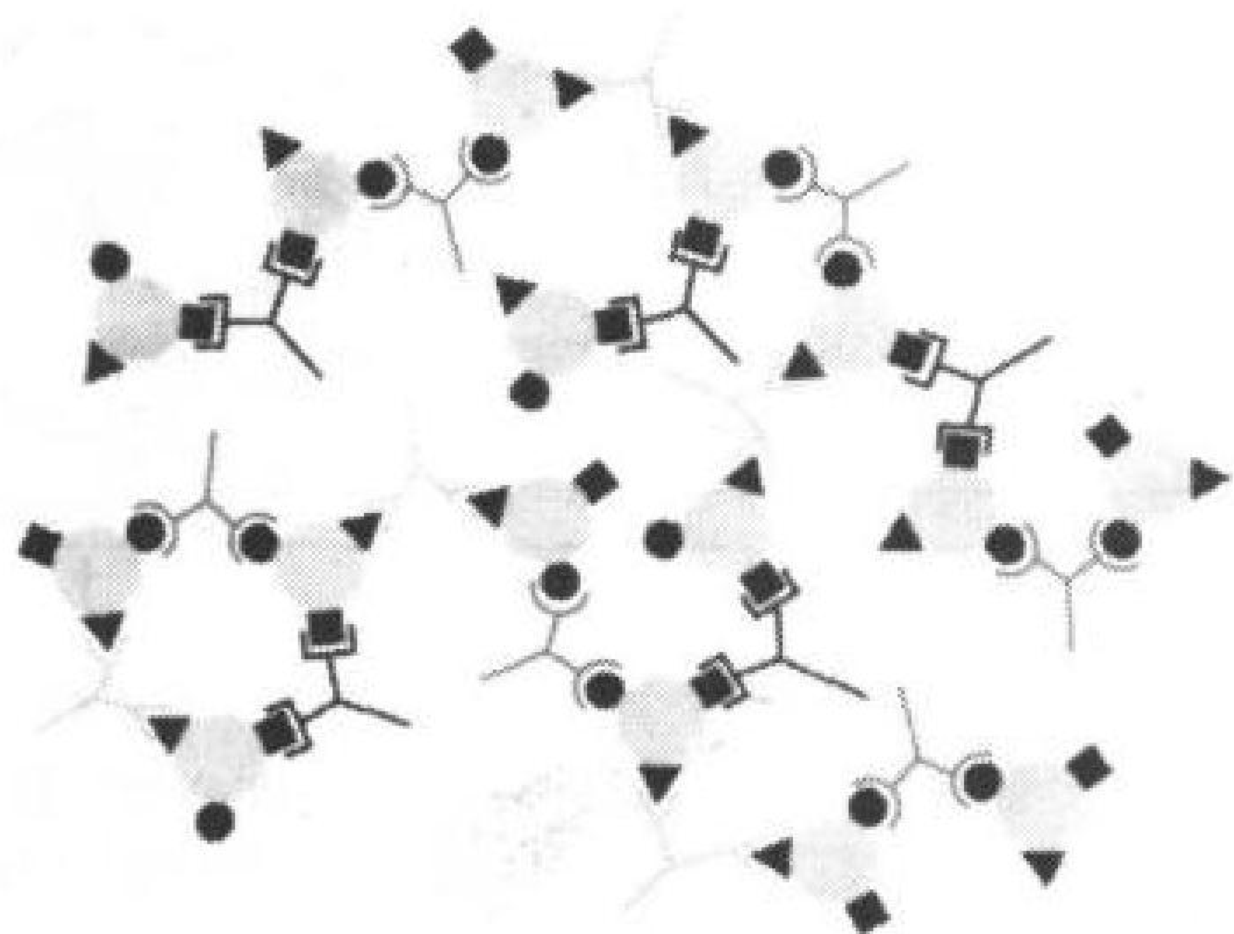


图 7-37　抗原通过抗体交联

二价抗体混合物可以形成由抗原与抗体组成的延伸网络，二价抗体可识别入侵的颗粒(如毒素分子或者细菌)的几个不同的抗原区域。

191

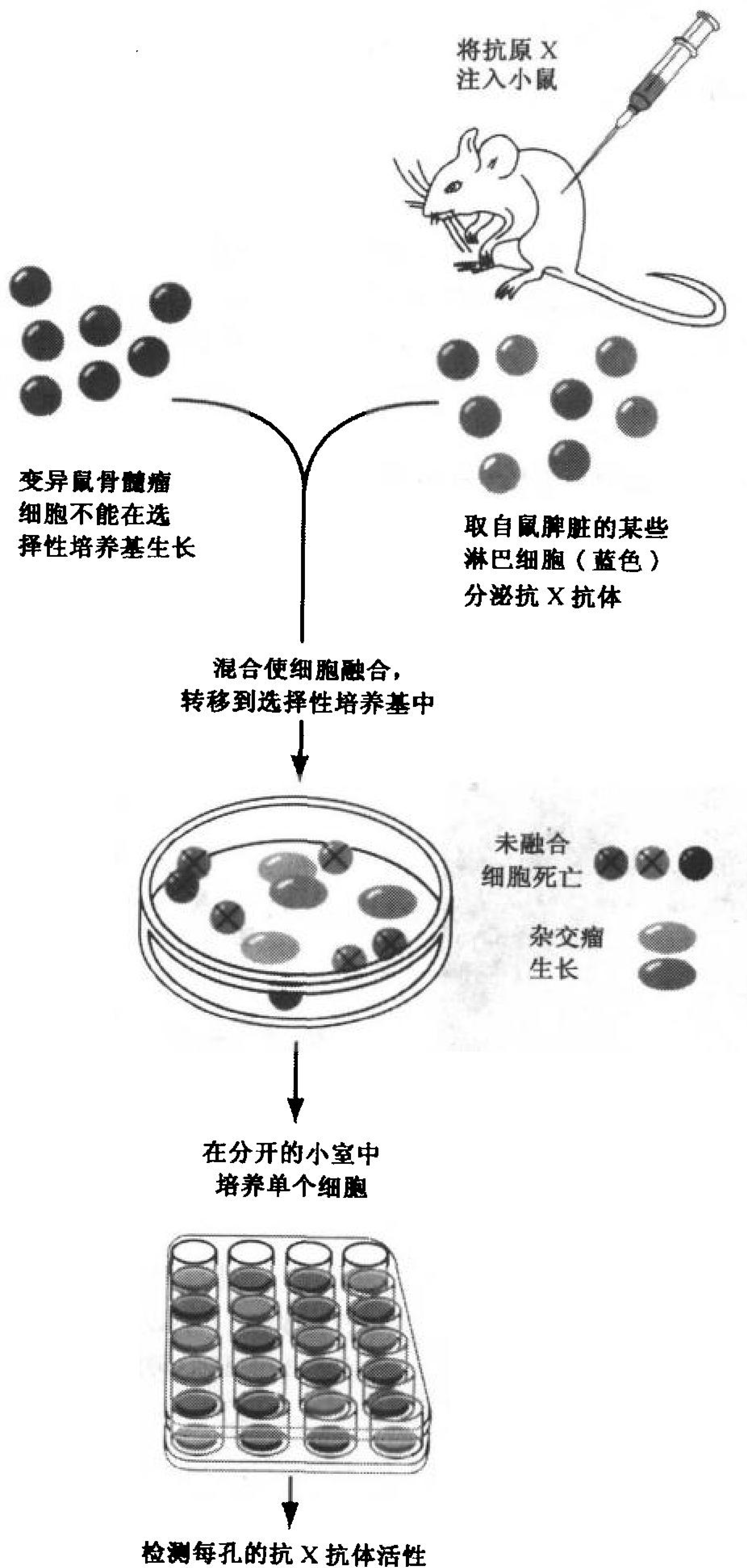
大多数免疫球蛋白是二价分子;就是说,它们能同时结合两个相同抗原(IgM 与 IgA 是多价的)。外源物质或有机体通常含有多个抗原区域,而典型的免疫反应产生具有不同特异性的多种抗体的混合物。二价使得抗体与抗原交联形成延伸的格子(图 7-37),加速对抗原的清除并触发

189 *B* 细胞增殖。

框 7-4 生物化学相关内容

单克隆抗体

将外源分子引入动物体内能够诱导合成大量抗原特异的但不同的抗体。人们希望从这样的动物中获得的单一淋巴细胞能够被克隆(能够重复生产)产生大量单一的免疫球蛋白分子。但遗憾的是淋



巴细胞不能在培养基中连续培养。1970 年后期 Cesar Milstein 和 Georges Kohler 发展了一种可以让细胞永久培养,并能无限制地分泌特异抗体的技术。通常来自经特异抗原免疫的鼠的淋巴细胞与具有无限繁殖能力的鼠的骨髓瘤细胞(一种血液癌症)融合。然后细胞在有选择的培养基中培养,该培养基抑制嘌呤合成,嘌呤对骨髓瘤细胞生长是必需的(骨髓瘤细胞缺少一种在生产嘌呤核苷酸旁路中起作用的酶)。能够在选择性培养基中生长的只能是融合的细胞,即杂交瘤细胞,它既有缺失的酶(由淋巴细胞提供),又具有由骨髓瘤贡献的无限繁殖能力。由单一融合细胞克隆而来的细胞经筛选寻找原始抗原的抗体。能产生抗体的细胞在组织培养基中或作为鼠宿主中的半固体瘤大量生产。

单克隆抗体可以用来纯化大分子(节 5-2),确定感染的疾病,检验体内药物或其他物质在体内存在情况。由于单克隆抗体的纯度和特异性,即它们的生物亲和性达到某种程度时,单克隆抗体作为抗肿瘤和其他疾病的治疗制剂也有广泛的前途。

D. 抗体多样性的产生

一种新的抗原并不能指导 B 细胞开始生产新的与其结合的免疫球蛋白,而是*一种抗原仅仅刺激一种原来已存在并恰巧能识别这种抗原的 B 细胞的增殖*。免疫系统有能力产生几十亿的不同抗体,足够与有机体能遇到的几乎所有的抗原反应。但是免疫球蛋白基因的数量如此小以至于远远不能说明观察到的抗体多样性水平。抗体序列的多样性来源于 B 细胞发育过程中的基因变化。

一个个体在一生中只合成其潜在的全部免疫球蛋白中很小的一部分。可能更重要的是免疫系统的能力只有在遇到外源物质时才开动,而且对内源(自身)的成千上万的不同分子不产生作用。几乎所有大分子都具有抗原性,这些可以通过从一个个体到另一个个体的组织移植排斥得到证明,这种排斥甚至在同一种内也会发生。这种不相容性对从传统的输血法到多器官移植都带来了巨大的挑战。

一个个体的免疫系统区分自己非己的原理还不是很清楚。它大概在出生的时候开始起作用并延续下来,因为新的淋巴细胞在个体一生中不断产生。偶尔,免疫系统会失去对自身抗原的耐受性,导致**自身免疫病**(autoimmune disease),其症状可能是温和的也可能是致命的(见框 7-5)。

框 7-5　健康和疾病的生物化学

自身免疫病

身体的所有器官理论上有可能被失去其自身免疫耐受性的免疫系统攻击,而且某些组织受到的攻击比其他组织更利害。一些最常见的自身免疫病列于下表。某一种病的症状反映出自身抗体与之反应的组织的类型。一般来说,自身免疫病是慢性的,通常有一段潜伏期,并且在不同个体间临床严重情况也不同。

对自身抗原失去耐受性可能是由于固有的生物机体区分自己非己的功能失常造成的,这种现象可由一些事件引起,如创伤或感染,在这样的条件下那些平时与免疫系统隔离的组织暴露给淋巴细胞。例如血脑屏障破坏使得淋巴细胞接触到脑和脊髓,伤害有可能涉及到关节的间隙,而这通常通过血管是无法进行的。还有一些证据表明自身免疫病可能是由抗病毒或细菌的抗体引起的,这样的抗体由于偶然的抗原相似性与内源物质进行交联反应。某些疾病如系统性红斑狼疮代表了一种免疫系统更广泛的损伤从而导致针对许多内源物质(如 DNA 和磷脂)的抗体的产生。

自身免疫疾病病理效应反映了免疫系统的复杂性，设计的免疫系统能够通过不同方式抵抗广泛多样的外来物质。作为一般抗感染的一部分，调节组织损伤的试剂在失控的免疫响应，例如自身免疫疾病中，产生不能调节的损伤。激素同样影响免疫响应过程，这也许能够解释为什么硬化症和系统性红斑狼疮在女性中的比例比男性高。细胞免疫和体液免疫的复杂性很难辨别自身性免疫疾病起因，也使得这些疾病难以治疗。这个领域内的研究表明自身免疫有引起或使其他一般疾病如动脉硬化变得复杂的可能性。

疾病	靶组织	主要症状
阿狄森(Addison)病	肾上腺皮质	低血糖，肌肉无力，Na^+ 流失，K^+ 滞留，对压力的耐受性增加
节段性(Crohn)回肠炎	肠内层	肠感染，慢性腹泻
格雷夫斯(Graves)病	甲状腺	甲状腺素的过量分泌引起食欲增加并伴随着体重下降
胰岛素依赖型糖尿病	胰腺的 β 细胞	丧失制备胰岛素的能力
多发性硬化症	脑和脊髓中神经纤维的髓鞘	极大丧失运动控制
重症肌无力	神经-肌肉突触上的乙酰胆碱受体	极度肌肉萎缩
牛皮癣	上皮	皮肤过度增殖
风湿病	结缔组织	关节发炎和退化
系统性红斑狼疮	DNA，磷脂和其他组织成分	出疹，关节和肌肉疼痛，贫血，肾损伤，精神异常

小　　结

1. 肌红蛋白，单体的含有血红素的肌肉蛋白，可逆地结合一个 O_2 分子。
2. 血红蛋白，具有假对称性的四聚体，在氧合和脱氧状态下的构象明显不同。
3. 氧以 S 型方式结合血红蛋白，表明了协同结合。
4. 结合血红素诱导整个血红蛋白分子的构象变化，其中包括在亚基界面上的移动和离子对的破坏，结果导致 T 态转换为 R 态。
5. CO_2 通过 Bohr 效应促进 O_2 脱离血红蛋白，BPG 通过结合脱氧血红蛋白降低血红蛋白的氧亲和性。
6. 血红蛋白的变异体揭示了结构与功能的关系。血红蛋白 S 通过以脱氧形式形成刚性的纤维而产生镰状细胞贫血病的症状。
7. 别构的对称和序变模型解释了一个配体在一个部位的结合是如何影响另外配体在其他部位的结合的。
8. 肌原纤维是由粗丝(由肌球蛋白组成)和细丝(由肌动蛋白、原肌球蛋白和肌钙蛋白组成)重复排列构成的。
9. 肌球蛋白分子的头部形成一个通向细丝中肌动蛋白的桥，以便肌球蛋白头部的脱离接触和再接触在肌肉收缩期间引起粗丝和细丝彼此滑动。ATP 水解提供了收缩的力。
10. 免疫系统通过产生抗体(免疫球蛋白)响应外来的大分子。
11. Y 形的 IgG 分子是由两条重链和两条轻链组成的。两个抗原结合部位是由在一条重链和一条轻链末端的可变结构域内的高变序列形成的。

参考文献

肌红蛋白和血红蛋白

Ackers, G.K., Doyle, M.L., Myers, D., and Daugherty, M.A., Molecular code for cooperativity in hemoglobin, *Science* **255**, 54–63 (1992).

Dickerson, R.E. and Geis, I., *Hemoglobin*, Benjamin/Cummings (1983). [A beautifully written and illustrated treatise on the structure, function, and evolution of hemoglobin.]

Nagel, R.L. and Roth, E.F., Jr., Malaria and red cell genetic defects, *Blood* **74**, 1213–1221 (1989).

Perutz, M.F., Wilkinson, A.J., Paoli, M., and Dodson, G.G., The stereochemical mechanism of the cooperative effects in hemoglobin revisited, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27**, 1–34 (1998).

Perutz, M.F., Myoglobin and haemoglobin: Role of distal residues in reactions with haem ligands, *Trends Biochem. Sci.* **14**, 42–44 (1989).

Riggs, A., Hemoglobins, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 915–921 (1991). [Includes a discussion of invertebrate hemoglobins.]

Urich, K., *Comparative Animal Biochemistry*, Chapter 7, Springer-Verlag (1994). [Discusses non-hemoglobin oxygen-transport proteins.]

Weatherall, D.J., Clegg, J.B., Higgs, D.R., and Wood, W.G., The hemoglobinopathies, *in* Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., and Frederickson, D.S. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (7th ed.), pp. 3417–3484, McGraw–Hill (1995).

肌球蛋白和肌动蛋白

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., and Watson, J.D., *Molecular Biology of the Cell* (3rd ed.), Chapter 16, Garland Publishing (1994).

Block, S.M., Fifty ways to love your lever: Myosin motors, *Cell* **87**, 151–157 (1996).

Milligan, R.A., Protein–protein interactions in the rigor actomyosin complex, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 21–26 (1996).

Milligan, R.A., Whittaker, M., and Safer, D., Molecular structure of F-actin and the location of surface binding sites, *Nature* **348**, 217–221 (1990).

Rayment, I. and Holden, H.M., Myosin subfragment-1: structure and function of a molecular motor, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3**, 944–952 (1993).

Spudich, J.A., How molecular motors work, *Nature* **372**, 515–518 (1994).

抗体

Davies, D.R. and Chacko, S., Antibody structure, *Acc. Chem. Res.* **26**, 421–427 (1993).

Davies, D.R. and Cohen, G.H., Interactions of protein antigens with antibodies, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 7–12 (1996).

Harris, L.J., Larson, S.B., Hasel, K.W., Day, J., Greenwood, A., and McPherson, A., The three-dimensional structure of an intact monoclonal antibody for canine lymphoma, *Nature* **360**, 369–372 (1992). [The first and, as yet, only high-resolution X-ray structure of an intact IgG.]

Lodish, H., Baltimore, D., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaria, P., and Darnell, J., *Molecular Cell Biology* (3rd ed.), Chapter 27, Scientific American Books (1995). [This chapter covers the immune system and antibody function.]

Male, D., Cooke, A., Owen, M., Trowsdale, J., and Champion, B., *Advanced Immunology* (3rd ed.), Mosby (1996). [Chapters 1 and 2 provide an overview of the immune system and antibody structure.]

Steinman, L., Autoimmune disease, *Sci. Am.* **269**(3), 107–114 (1993).

关　键　词

血红素　heme

Perutz 机制　Perutz machanism

别构作用　allosteric interaction

细胞免疫　cellular immunity

氧合　oxygenation

T 状态　T state

横纹肌　striated muscle

体液免疫　humoral immunity

Y_{O_2}

R 状态　R state

肌原纤维　myofibril

淋巴细胞　lymphocyte

pO_2

Bohr 效应　Bohr effect

肌节　sarcomere

免疫球蛋白　immunoglobulin

双曲线　hyperbolic curve

红细胞　erythrocyte

粗丝　thick filament

记忆 B 细胞　memory B cell

饱和　saturation

变异体　variant

细丝　thin filament

Fab 片段　Fab fragment

p_{50}

裂解　lyse

丝滑动模型　sliding filament model

Fc 片段　Fc fragment

配体　ligand

贫血病　anemia

ATP 酶 ATPase
可变区 variable regim
S 型曲线 sigmoidal curve
发绀 cyanosis
微丝 microfilament
免疫球蛋白折叠 immunoglobulin fold
协同结合 cooperative binding
红细胞增多(症) polycythemia
免疫荧光显微镜 immunoflurescence microseopy
高变性 hypervariability
Hill 方程 Hill equation
杂合子 heterozygote
踏车 treadmilling
单克隆抗体 monoclonal antibody
Hill 常数 Hill constant
纯合子 homozygote
病原体 pathogen
自身免疫性疾病 autoimmune disease
正协同性 positive cooperativity
血红蛋白 S hemoglobin S
免疫系统 immune system
负协同性 negative cooperativity
镰状细胞贫血病 sickle-cell anemia

学习思考题

1. 描述肌红蛋白和血红蛋白之间在结构和功能方面的差别。
2. 解释血红蛋白是如何有效地在肌肉中将 O_2 传递给肌红蛋白的。
3. 解释 O_2 协同结合血红蛋白的结构基础。
4. 什么是波尔效应的相关性。
5. BPG 是如何影响 O_2 与血红蛋白结合的。
6. 别构的对称和序变模型的差别。
7. 画一个肌原纤维成分的示意图。
8. 解释肌肉收缩的丝滑动模型的分子基础。
9. 确定免疫球蛋白分子的各个部分。

练 习 题

1. 从下面描述一个配体结合蛋白的数据计算 K 值。

[配体]/(mmol·L^{-1})	Y
0.25	0.30
0.5	0.45
0.8	0.56
1.4	0.66
2.2	0.80
3.0	0.83
4.5	0.86
6.0	0.93

2. 下面的哪组结合数据(见下页表)表现出配体与寡聚蛋白的协同结合特征。
3. 在(a)血红蛋白 Yakima 和(b)血红蛋白 Kansas 中的 p_{50} 比正常的高还是低?

(a)[配体]/(mmol·L^{-1})	Y
0.1	0.3
0.2	0.5
0.4	0.7
0.7	0.9

(b)[配体]/(mmol·L^{-1})	Y
0.2	0.1
0.3	0.2
0.4	0.6
0.9	0.8

4. 严重贫血病人的血红蛋白 S 纯合子在他们的红细胞中常常具有高水平的 BPG，这是一种有利的效应吗？
5. 鳄鱼不呼吸在水下可以呆 1h，将被捕获的呼吸空气的动物淹死，然后在空闲时吃。有助于鳄鱼这样作的理由是它可以 100%利用血液中的 O_2，而人大约只能利用血液中 O_2 的 65%，而且鳄鱼血红蛋白不结合 BPG。然而鳄鱼血红蛋白能很好地结合 HCO_3^-。这是如何帮助它获得美食的呢？
6. 一个肌球蛋白头部每秒钟能经历 5 个 ATP 水解循环，每次水解都使肌动蛋白移动约 60Å。对于一个完整的肌节，以同样的周期缩短 1000Å，如何去实现？
7. 尸僵，即死后肌肉变得僵硬的现象是由于细胞内 ATP 缺失引起的。给出尸僵的分子基础。
8. 给出在以下条件下分析得出的免疫球蛋白的大致相对分子质量：(a)凝胶过滤；(b)SDS-PAGE；(c)有巯基乙醇存在下的 SDS-PAGE。
9. 解释为什么在免疫球蛋白的 V_L 和 V_H 结构域的变异被极大地限制形成高可变环？
10. 为什么抗体能抵御天然的蛋白，而有时却不能与相应的变性蛋白结合？
11. 针对大分子抗原的抗体，当与它的抗原混合时通常都形成抗原-抗体沉淀，解释为什么当(a)来自这些抗体的 Fab 片段与抗体相应的抗原混合；(b)针对小抗原的抗体与小的抗原混合；(c)抗体量远远超过相应的抗原进行同样实验没有沉淀形成？

(清华大学　王希成　译　郑昌学　校)

第 8 章　碳水化合物



糖是相对简单的分子，可以通过各种方式相连形成大分子，例如淀粉，这种碳水化合物的贮存形式是很多食物如面包、米饭、意大利面食中的基本能量来源。（引自 Charles, D. Winters)

碳水化合物(carbohydrate)或**糖类**(saccharide)(希腊文:sakcharon, sugar)是含量最丰富的生物分子。在化学组成上它们比核苷酸或氨基酸简单,仅由三种元素——碳、氢和氧——按化学式 $(C \cdot H_2O)_n$ 组成,其中 $n \geqslant 3$。碳水化合物的基本单元称为**单糖**(monosaccharide)。正如我们下面要讨论的,单糖有许多不同的类型,它们的区别在于碳原子数目以及与这些碳原子相连的氢原子和氧原子的排列方式不同。此外,单糖能够以几乎无限多的方式串连在一起形成**多糖**(polysaccharide)。 196

20世纪60年代以前,人们认为碳水化合物仅仅具有充当能源(如葡萄糖和淀粉)和结构物质(如纤维素)的被动作用。正如我们将要看到的,碳水化合物不能像蛋白质那样催化复杂的化学反应,也不能像核酸那样自我复制。又由于多糖不像核酸和蛋白质那样根据基因"蓝图"建造,因此,在大小和组成上它们倾向于比其他生物分子更加不均一。

然而,人们已经清楚碳水化合物内在结构的变异是其生物活性的基础。碳水化合物在蛋白质和细胞表面貌似乎随机的排列,是蛋白质之间以及细胞之间许多识别活动的关键。只有了解碳水化合物的结构,从最简单的单糖到最复杂的分支多糖,才能正确评价糖类在生物系统中各种各样的功能。

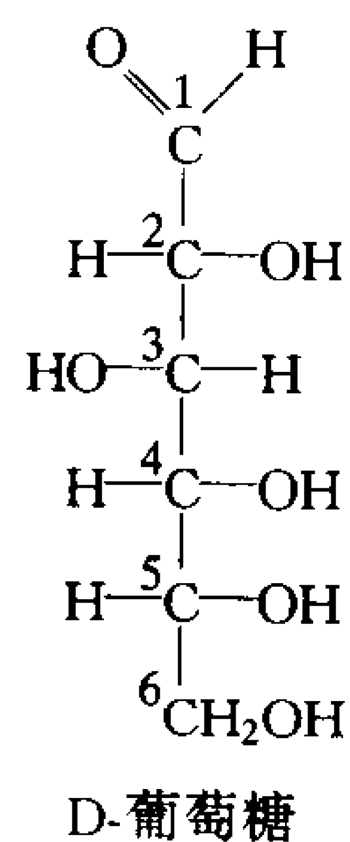
1. 单糖

单糖,或称为简单的糖类,是由较小的前体合成的,根本上这些前体都是经由 CO_2 和 H_2O 经光合作用衍生出来的。

A. 单糖的分类

*单糖是至少含有3个碳原子的直链多羟醇的醛或酮衍生物。*根据它们所含羰基的化学性质以及碳原子的数目分类。如果羰基是醛,则为**醛糖**(aldose);如果羰基是酮,则为**酮糖**(ketose)。最小的单糖含3个碳原子,称为**丙糖**,含4、5、6、7个碳原子的糖分别称为**丁糖**、**戊糖**、**己糖**和**庚糖**等。

己醛糖 **D-葡萄糖**的化学式为 $(C \cdot H_2O)_6$



D-葡萄糖

6个碳原子中仅2个碳原子C1和C6是手性中心,因此D-葡萄糖是16($2^4=16$)种可能的立体异构体中的一种。D-醛糖的立体化学和命名见图8-1。根据Fischer法则规定D或L(节4-2),*D糖距离羰基最远的不对称中心上的绝对构型与D-甘油醛相同*(例如,D-葡萄糖C5上的—OH在Fischer投影中位于右边)。L糖是其相应的D糖的对映体。 197

仅一个C原子构型不同的糖互为**差向异构体**(epimer)。D-葡萄糖和**D-甘露糖**就是C2构型不同的差向异构体。

最常见的酮糖的羰基在C2上(图8-2)。羰基的位置使酮糖比其异构体醛糖少了一个不对称中心,所以己酮糖仅有 $2^3=8$ 种可能的立体异构体(4种D糖和4种L糖)。注意,命名一些酮糖是在其相应的醛糖后缀-ose前加上ul-,因此,**D-木糖**(D-xylose)相应的酮糖为**D-木酮糖**(D-xylulose)。 198

由于生物学中L糖远比D糖为少,因此D前缀常被省略。最重要的单糖是醛糖中的甘油

醛、**核糖**、**葡萄糖**、**甘露糖**和**半乳糖**,以及酮糖中的**二羟丙酮**、**核酮糖**和**果糖**。在学习新陈代谢时,我们将接触到这些物质。

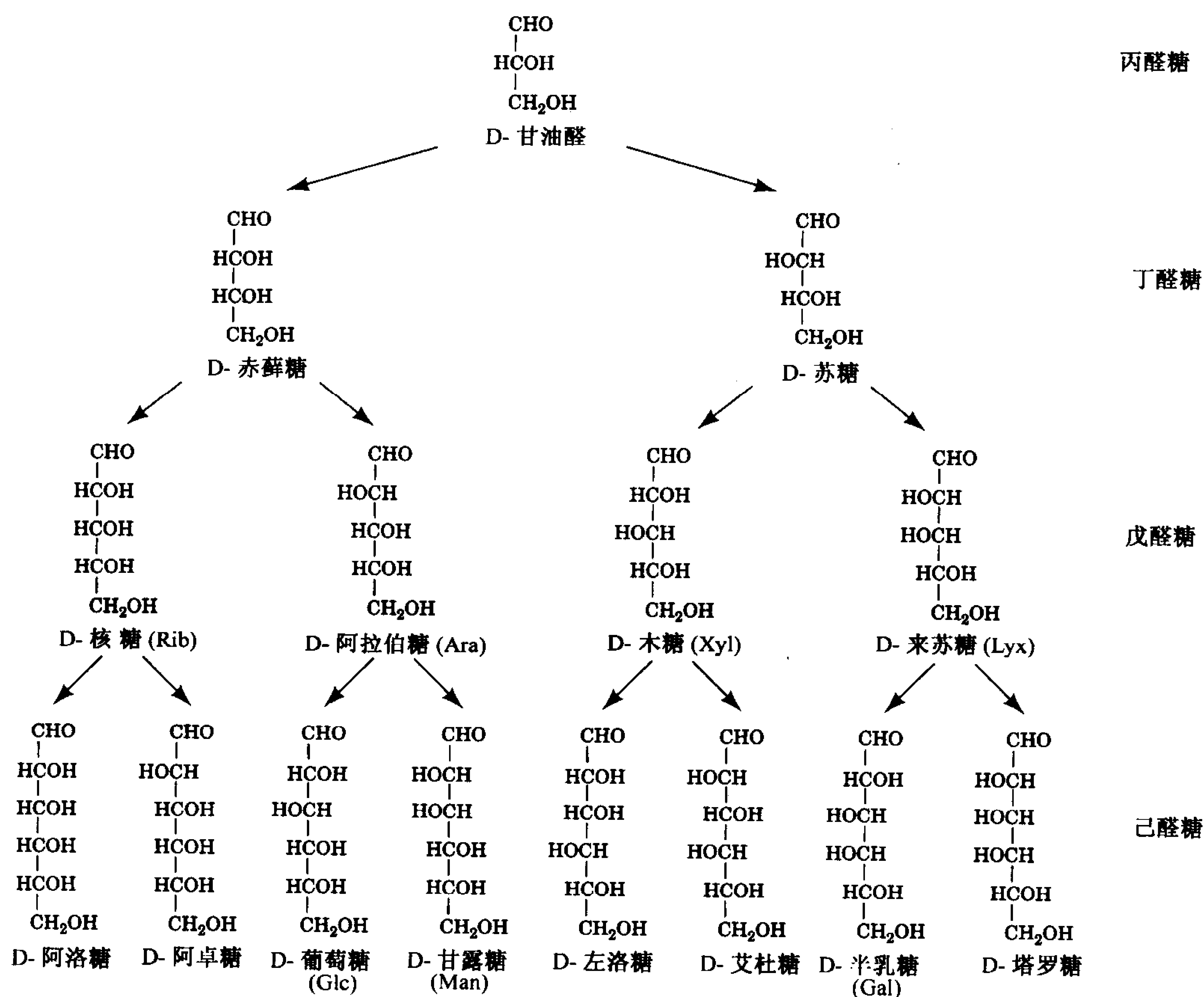
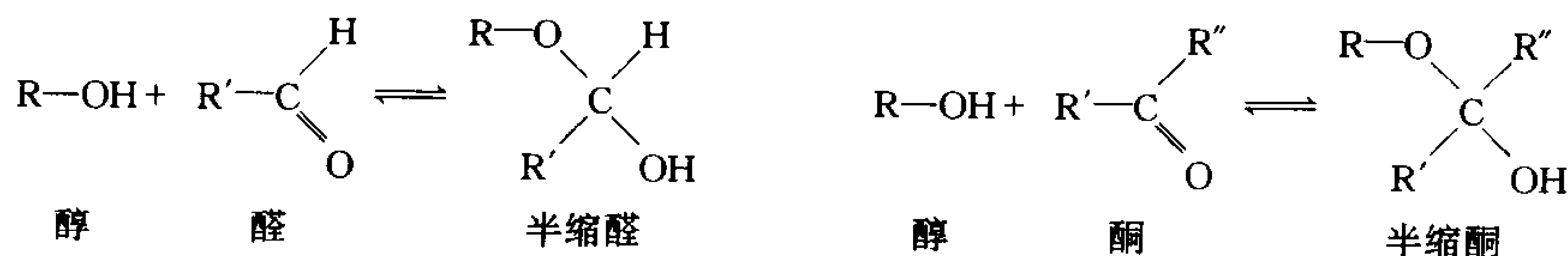


图 8-1 3~6 个碳原子的醛糖

箭头表示立体化学关系(不是生化合成途径),C2(红色)周围的构型把每对单糖中的两种糖区分开来。这 15 种糖的 L 对应物就是它们的对映体。

B. 构型和构象

醇与醛或酮的羰基反应,分别形成**半缩醛**(hemiacetal)和**半缩酮**(hemiketal)。

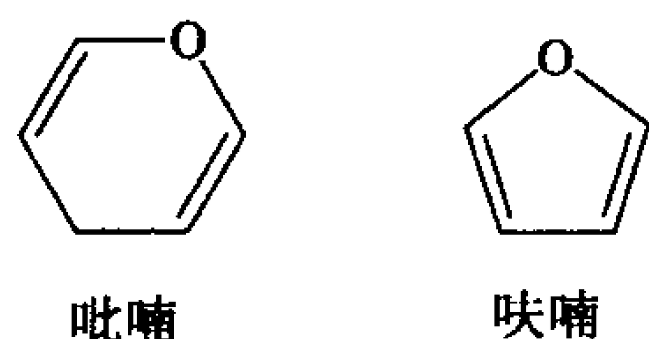


单糖中的羟基在分子内能够与醛或酮发生类似的反应生成环状半缩醛或半缩酮(图 8-3)。通过 **Haworth 投影**可以方便地表示出这些糖环中每个碳原子上取代基的构型。在 Haworth 投影中,深色环键投影在纸平面前,浅色环键投影在纸平面后。

含六元环的糖称为**吡喃糖**(pyranose),因为它们的结构与含有这种环的最简单的化合物**吡喃**(pyran)类似。同样,含五元环的糖因其与**呋喃**(furan)类似而称为**呋喃糖**(furanose)。

200

因此，含六元环的葡萄糖和含五元环的果糖分别称为**吡喃葡萄糖**（glucopyranose）和**呋喃果糖**（fructofuranose）。



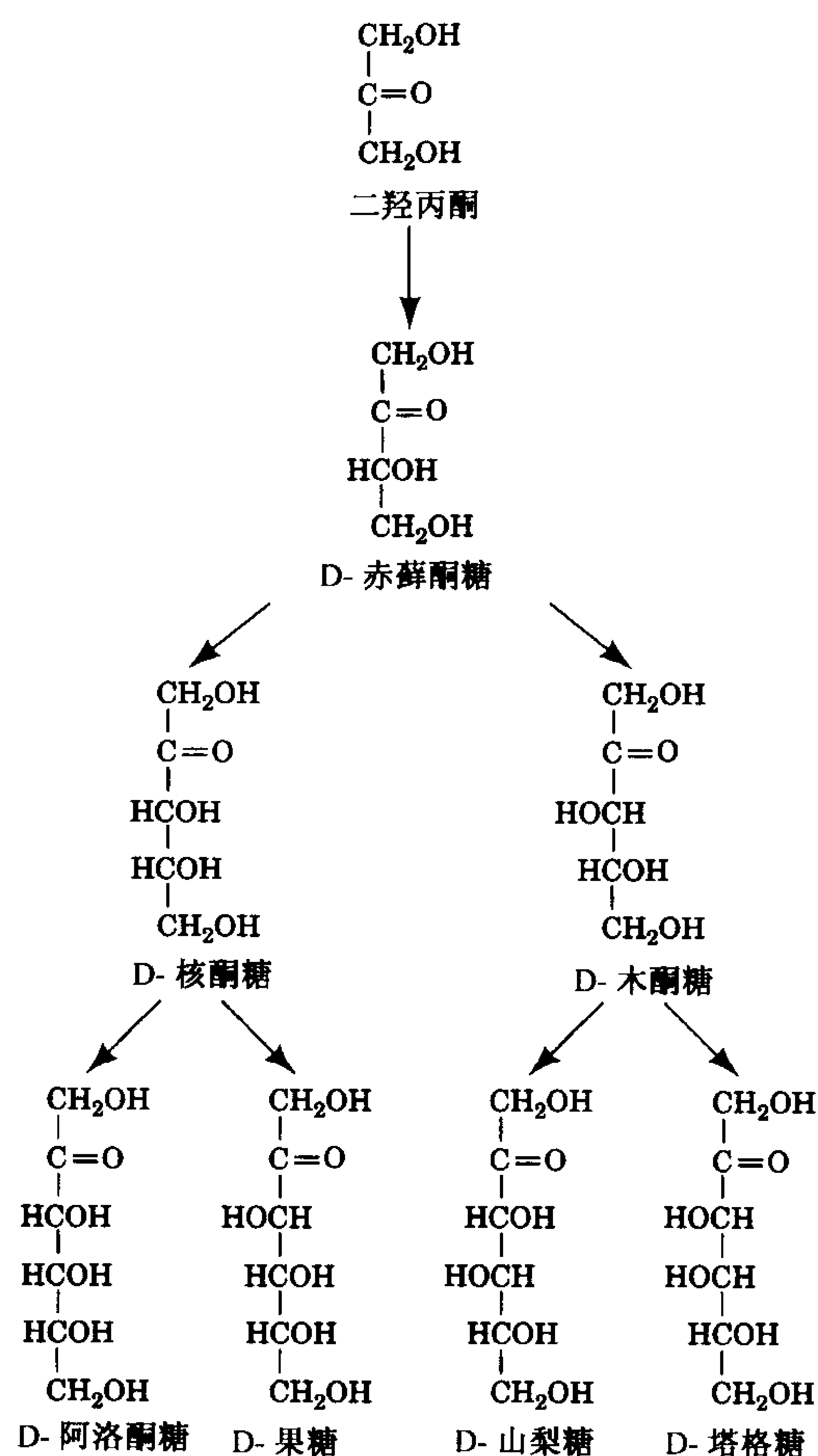


图 8-2　3～6 个碳原子的 D-酮糖

C3（红色）的构型把每对单糖中的两种糖区分开来。

环状糖有两种异头构型

当单糖环化时，它的羰基碳即**异头碳**（anomeric carbon）成为具有两种可能构型的手性中心。这样的一对仅异头碳不同的立体异构体，称为**差向异构体**（anomer）。在 α-异头体中，异头碳上的—OH 取代基和在手性中心（己糖中的 C5）上的—CH_2OH 基团分别位于糖环的相反侧，这就规定了 D 构型或 L 构型。另一种异头体为 β 型（图 8-4）。

D-葡萄糖的两种异头体在理化性质上稍有区别，包括具有不同的旋光性（节 4-2）。*在水溶液中，异头体可自由地相互转换*，因此，达到平衡时 D-葡萄糖是 β（63.6%）和 α（36.4%）异头体的混合物。线型通常仅占极微量。

糖类的构象易变性

己糖或戊糖可采取吡喃糖或呋喃糖的形式。理论上，己糖及更大的糖可以形成七元环或更多原子数的环，但是这些环很少见，因为五元环和六元环更稳定。三元环和四元环的内部张力使其比线型更不稳定。

采用 Haworth 投影式也许会导致一个错误的印象，即吡喃糖环和呋喃糖环都是平面的。然而，事实并非如此，因为环中原子的所有原子轨道都是四面（sp^3）体杂交的，与环己烷环一样，吡喃糖环可以采取椅式构象。在椅式构象中，每个原子的取代基均呈四面体排布。在两种可能的椅式构象中，环上最大的取代基处于**赤道**（平伏）位置是主要的构象，而不是最大取代基处于较密集的**轴向**位置（图 8-5）。只有 β-D-葡萄糖的所有 5 个非氢取代基能同时处于赤道（平伏）位置。为什么葡萄糖是自然界中最丰富的单糖，原因很可能就在于此。

201

呋喃糖环也能采取不同的构象，其稳定性取决于大取代基的位置。注意，单糖容易转变其构象，因为这一过程中并无键的断裂。在水溶液中，α-和 β-异头型之间、吡喃糖与呋喃糖之间发生缓慢的构型转变，因为涉及到键的断裂与再生。其他构型上的变化，例如，**差向异构化**（epimerization），在生理条件下要有适当的酶参与才能发生。

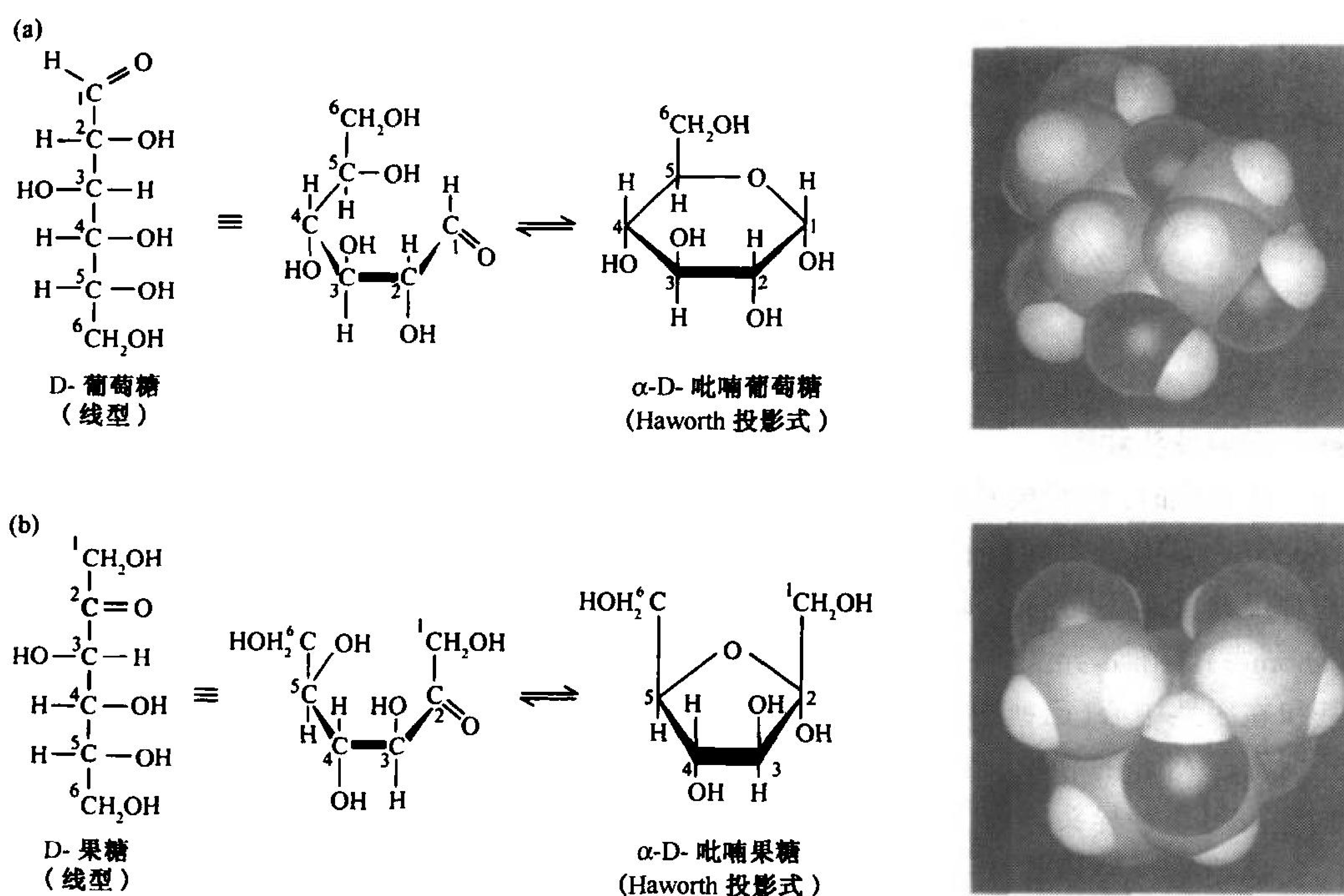


图 8-3 结构的秘诀：葡萄糖和果糖的环化

(a)线型 D-葡萄糖生成环状半缩醛 α-D-吡喃葡萄糖。(b)线型 D-果糖生成半缩酮 α-D-呋喃果糖。环状糖以 Haworth 投影和空间充填模型显示。(引自 Robert Stodeda, Fox Chase 癌症中心)

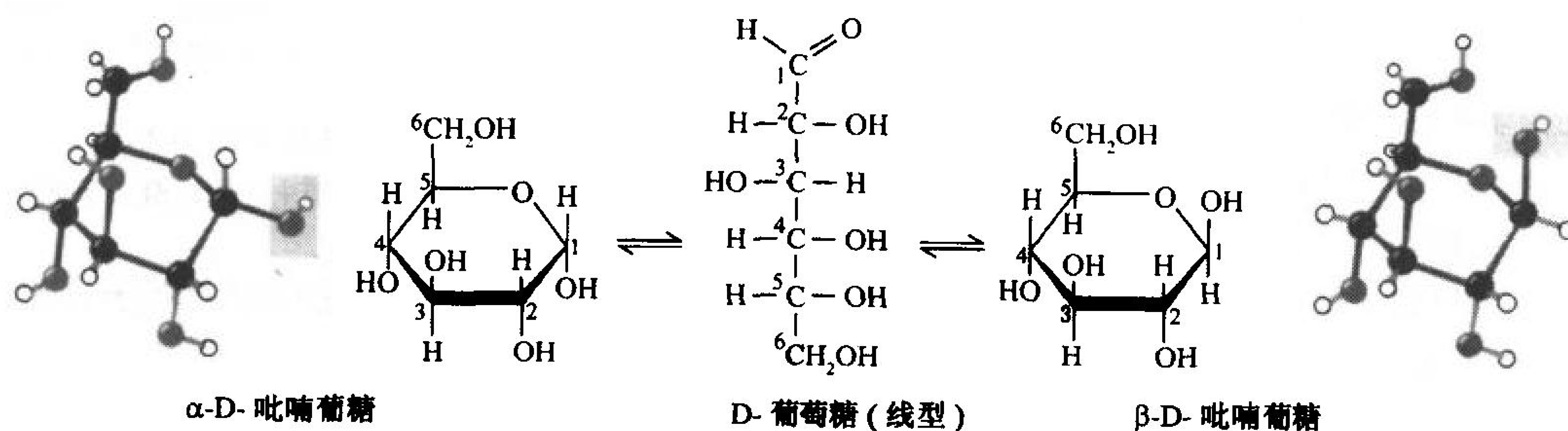


图 8-4 α 和 β 端基差向异构体

图中给出单糖 α-D-吡喃葡萄糖和 β-D-吡喃葡萄糖的 Haworth 投影式及球棍模型，两者通过线型相互转换。它们的区别仅在于异头碳 C1 的构型不同。

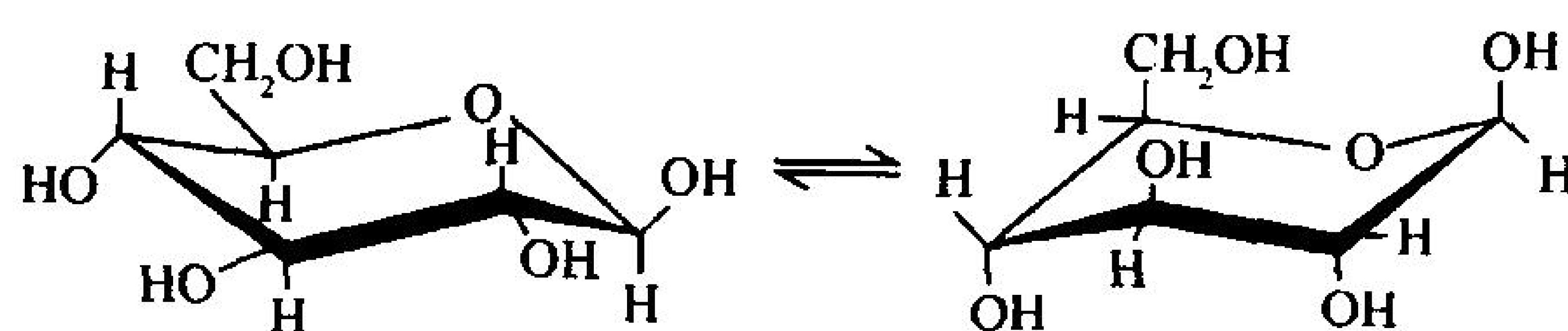


图 8-5 β-D-吡喃葡糖的两种椅式构象

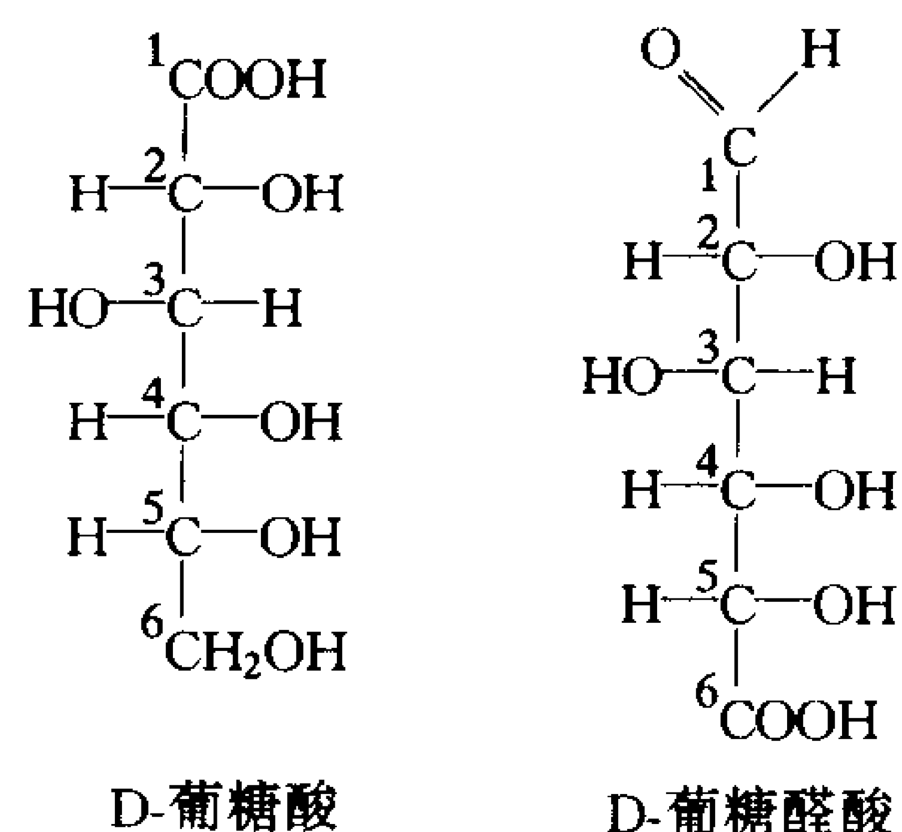
左边是主要的构象，其中相对大的取代基 CH_2OH 和 OH 均处于赤道(平伏)位置，向环的上方或下方伸展。在右边的构象(图 8-4 中右边的球棍模型)中，大取代基处于较密集的轴向(垂直)位置。

C. 糖的衍生物

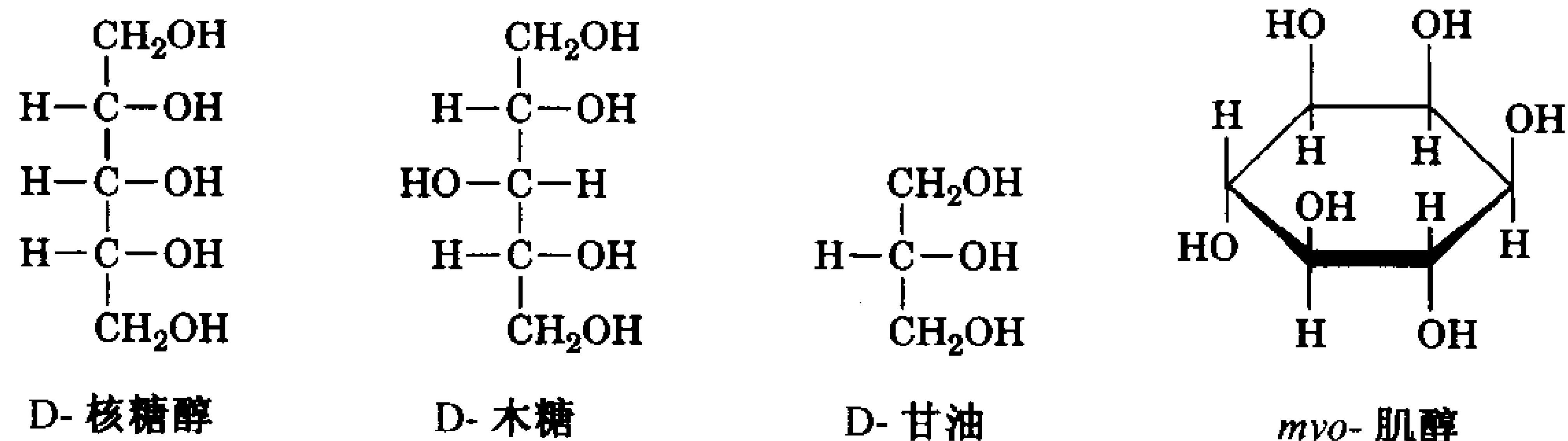
由于醛糖和酮糖的环型与线型分子之间确实可以相互转变,因此糖类的反应具有典型的醛和酮的特性。

1)温和的化学或酶氧化可以使醛糖的醛基转变为羧基,从而产生**醛糖酸**(aldonic acid),例如,**葡糖酸**(gluconic acid)(见右侧)。醛糖酸的命名是在原来醛糖的字根 aldose 后加上后缀-onic acid。

2)特异性氧化醛糖的伯醇基产生**糖醛酸**(uronic acid)。糖醛酸的命名是在原来醛糖的字根 aldose 后加上-uronic acid。例如,**D-葡糖醛酸**(D-glucuronic acid)(见右侧)。糖醛酸可采取吡喃糖、呋喃糖和线型 3 种形式。

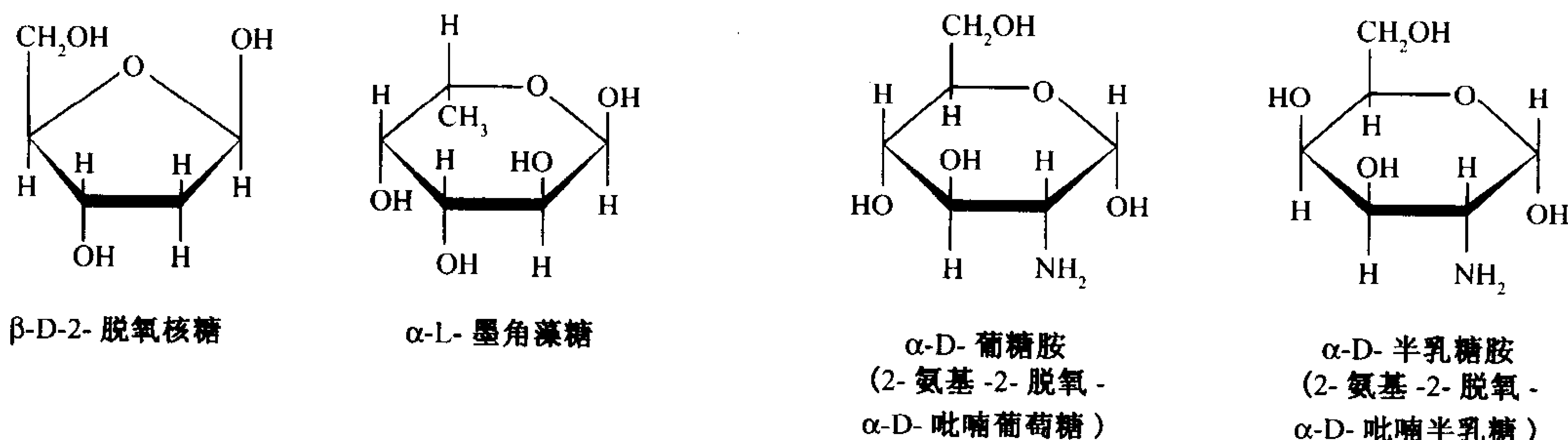


3)醛糖和酮糖均可在温和条件下被还原,例如,用 $NaBH_4$ 处理可产生无环的多羟醇,称为**糖醇**(alditol)。其命名是在字根 aldose 后加上后缀-itol。**核糖醇**(ribitol)是黄素辅酶的组成成分之一(图 3-3)。**甘油**(glycerol)和环状多羟醇——**肌醇**(myo-inositol)是重要的脂类成分(节 9-1)。**木糖醇**(xylitol)是制备无糖型口香糖和糖果使用的一种增甜剂。



4)单糖单元中的 OH 基团被 H 取代后就成为**脱氧糖**,在生物学上最重要的脱氧糖是 **β-D-2-脱氧核糖**(见下图),它是构成 DNA 的糖-磷酸主链的糖类成分(图 3-6)。**L-墨角藻糖**(L-fucose)是多糖组分中少数几种 L 糖中的一种。

202



5)在**氨基糖**(amino sugar)分子中,一个或多个 OH 基通常已被乙酰化的氨基所取代,**D-葡糖胺**和 **D-半乳糖胺**是最常见的(上图)。从 ***N*-乙酰甘露糖**和**丙酮酸**衍生出的 ***N*-乙酰神经**

氨糖酸(图 8-6)是**糖蛋白**(glycoprotein)和**糖脂**(glycolipid)(蛋白质和脂类通过共价键与碳水化合物相连)的一种重要组分。*N*-乙酰神经氨糖酸及其衍生物通常被称为**唾液酸**(sialic acid)。

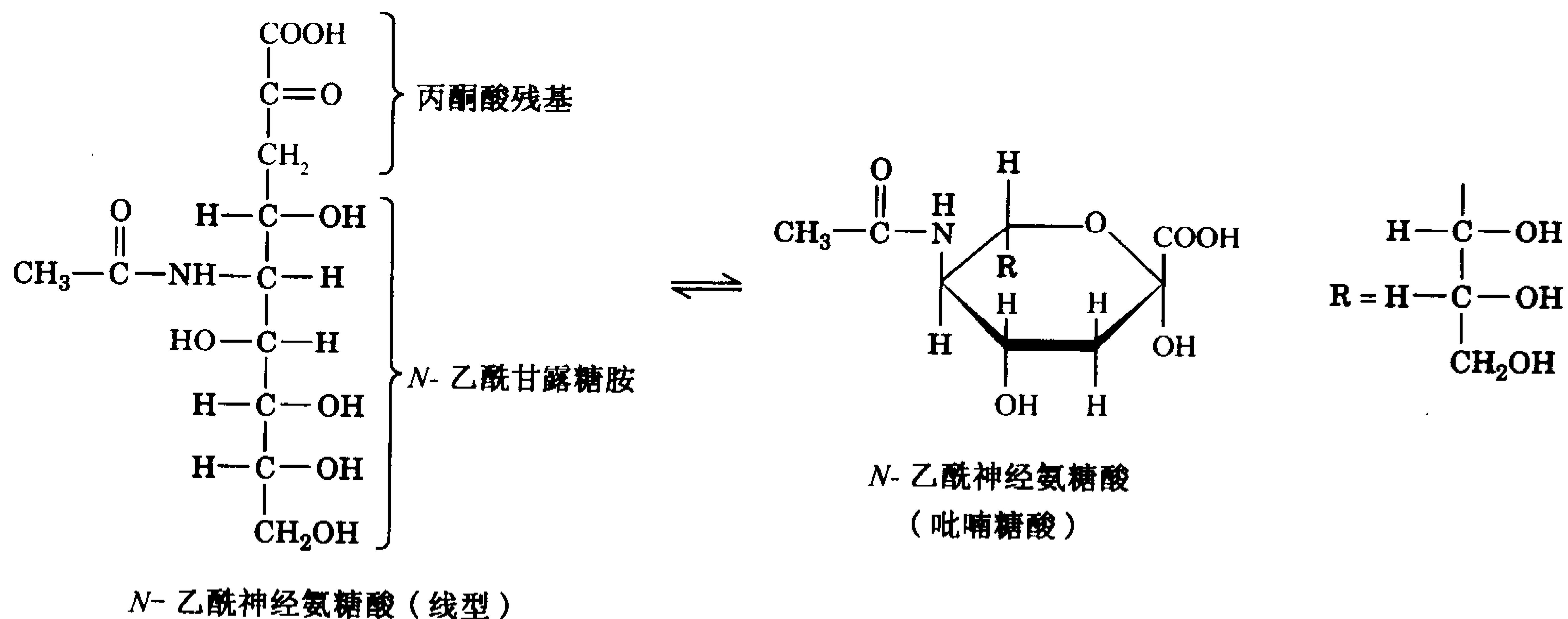
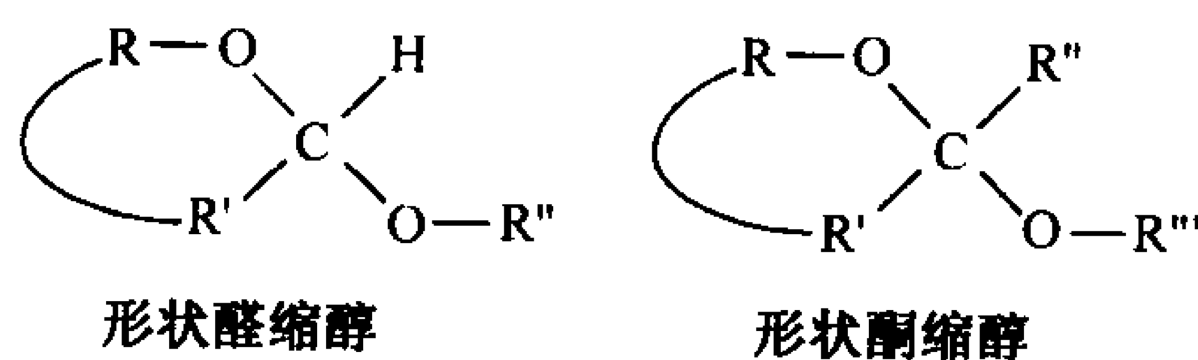


图 8-6 *N*-乙酰神经氨糖酸

在含有 9 个碳的环状单糖中，丙酮酸残基(蓝色)与甘露糖部分合并形成吡喃糖环。

6)糖类的异头基团能够与醇缩合形成 α-和 β-**糖苷**(glycoside)(希腊语:glykys sweet;图 8-7),即环状**醛缩醇**(acetal)或**酮缩醇**(ketal)。



连接异头碳和醇氧原子的键称为**糖苷键**(glycosidic bond)。异头碳和胺之间形成的 N-糖苷键是核酸中连接 D-核糖与嘌呤和嘧啶的键(图 3-6)。和肽键一样,在缺少适当的水解酶的生理条件下,糖苷键的水解极慢。

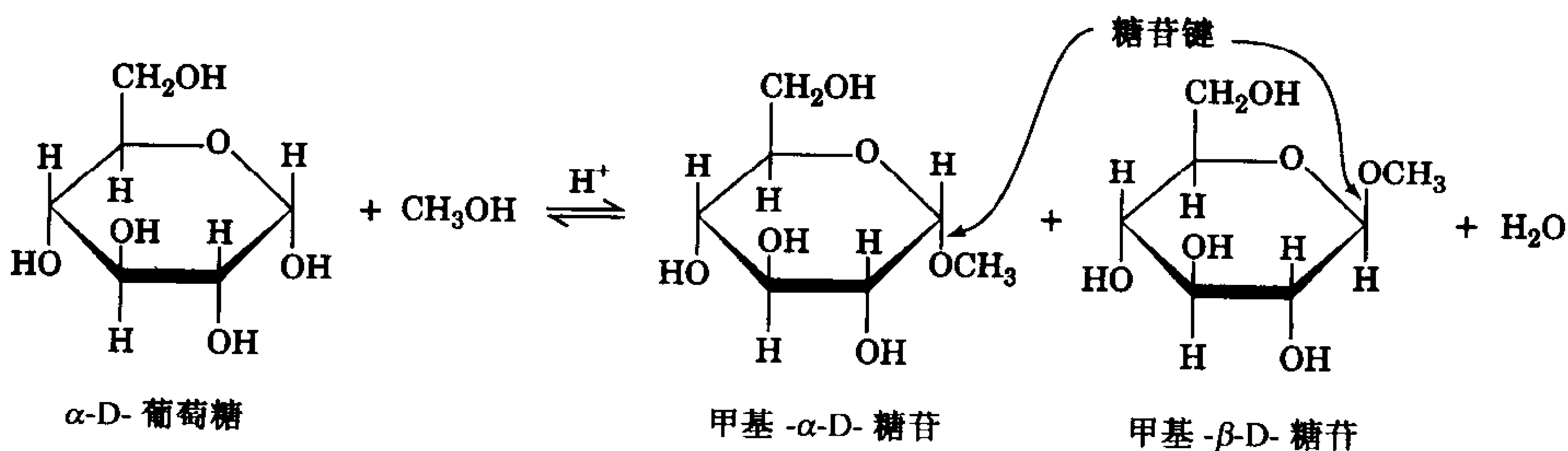


图 8-7 糖苷的形成

在酸催化下,α-D-葡萄糖与甲醇缩合产生一对异头甲基-D-糖苷异构体。

2. 多糖

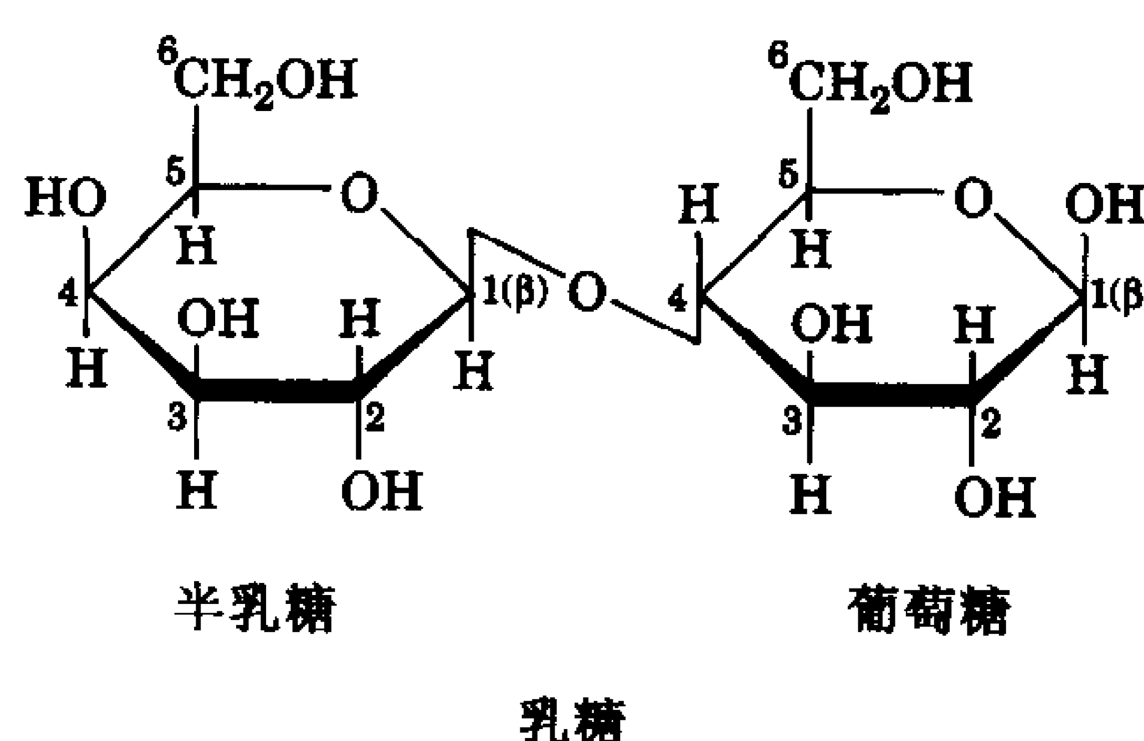
多糖，也称为聚糖，是由单糖通过糖苷键连接而成。多糖分为**同型多糖**(homopolysaccharide)和**异型多糖**(heterpolysaccharide)，分别由一种和多于一种类型的单糖组成。原则上，虽然异型多糖中的单糖序列比蛋白质中的氨基酸序列更易变化，但是很多异型多糖仅由少数几种单糖组成，这些单糖交替以重复序列出现。

与蛋白质和核酸不同，多糖形成分支和线性多聚体，这是因为糖苷键可以在单糖的任何一个羟基上形成。对于结构生物化学家来说，幸运的是大多数多糖是线性的，只以少数几种非常确定的方式形成分支。

对**寡糖**(oligosaccharide)或多糖完整的描述应包括鉴定、异头型以及所有的单糖组成单元的连接键。用特异性的**外切糖苷酶**(exoglycosidase)和**内切糖苷酶**(endoglycosidase)可以获得上述部分信息。水解单糖单元的这些酶与从多肽上切割氨基酸残基的外切肽酶和内切肽酶的作用方式非常相似(节5-3)。NMR测定法对于多糖序列和构象的测定极有价值。

A. 二糖

最简单的多糖是**二糖**(disaccharide)，例如**乳糖**(lactose)(见右侧)。在自然界中，乳糖仅存在于乳汁中，浓度为0%～7%，随物种而异(见框8-1)。乳糖的系统学名为O-β-D-吡喃半乳糖-(1→4)-D-吡喃葡萄糖，其命名指明了组成它的单糖、环类型和连接方式。符号(1→4)表示糖苷键连接半乳糖的C1和葡萄糖的C4。注意，乳糖中的葡萄糖残基有一个自由的异头碳。异头碳未形成糖苷的糖类称为**还原糖**，因为它们容易还原温和的氧化剂。由于多糖的组成单糖几乎总是以糖苷键相连，因此作为还原糖的多糖一般仅有一个残基缺少糖苷键，即所谓的**还原端**。

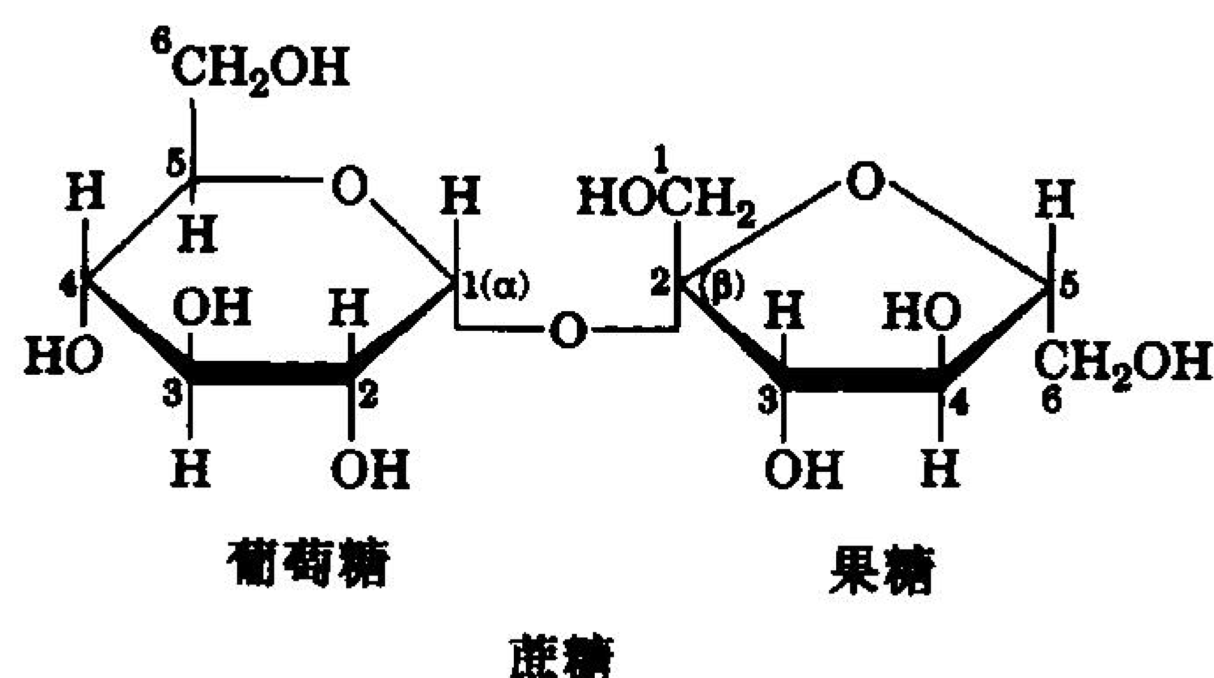


乳糖

> **框8-1 健康和疾病的生物化学**
>
> **乳糖不耐受性**
>
> 在婴儿体内，乳糖(也称为奶糖)由肠酶β-D-半乳糖苷酶(或乳糖酶)水解为组成它的单糖后，被吸收进入血液。半乳糖可酶促转变(差向异构化)为葡萄糖，葡萄糖是许多组织的首要代谢能源。
>
> 由于哺乳动物断奶后不可能再接触到乳糖，所以大多数成年哺乳动物只含有低水平的β-半乳糖苷酶。因此，当它们摄入乳糖时，其中大部分经由消化道进入结肠；在结肠中，细菌发酵产生大量的CO_2、H_2和刺激性有机酸。这些产物常常带来麻烦并引起疼痛性消化不适，即乳糖不耐受性。
>
> 乳糖不耐受性曾被认为是一种代谢紊乱，实际上，在成年人，尤其是有非洲和亚洲血统的人中是正常现象。可是有趣的是，历史上终身依赖乳制品为营养的人群，其后裔的β-半乳糖苷酶水平随年龄的增长仅仅稍有下降。现代食品技术对具有乳糖不耐受性的牛奶爱好者们提供了帮助：到处可以获得乳糖已被酶水解的牛奶。

最丰富的二糖是**蔗糖**(sucrose)(见下图)，它是植物中碳水化合物被运输的主要形式。作为

常见的餐桌糖，蔗糖是我们所熟悉的。蔗糖的系统名为 O-α-D-吡喃葡萄糖基-(1→2)-β-D-呋喃果糖苷，表明了每种糖形成糖苷键的异头碳(葡萄糖中的 C1 和果糖中的 C2)。

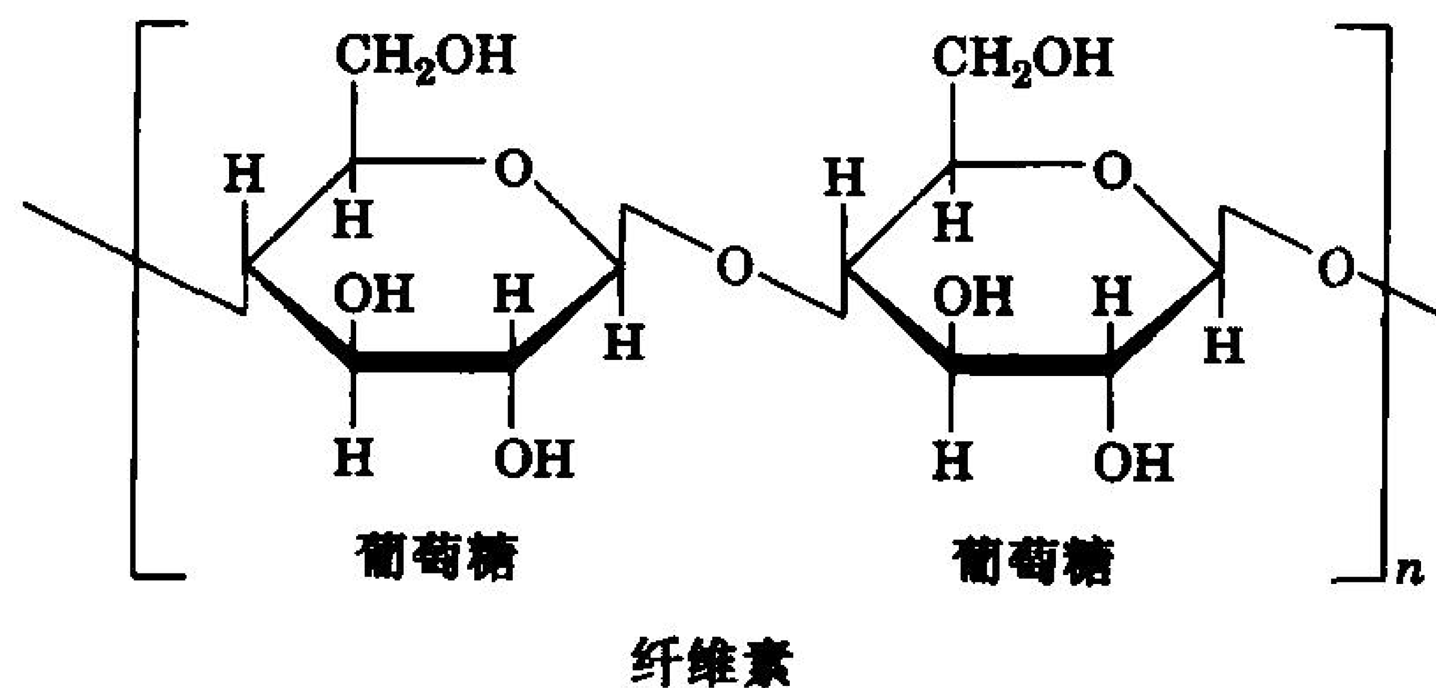


蔗糖

其他常见的二糖出现于较大的多糖的水解产物中。在自然界中只存在少数三糖和更大的寡糖，它们都存在于植物中。

B. 结构多糖：纤维素和几丁质

植物有坚固的细胞壁，能够抵抗胞外和胞内空间之间高达 20atm 的渗透压差异。在大型植物中，例如树木，其细胞壁也具有负载承受的功能。植物细胞壁主要的结构成分——**纤维素**(cellulose)(图 8-8)占生物圈中半数以上的碳：据估计每年合成和降解的纤维素约 10^{15}kg。



纤维素

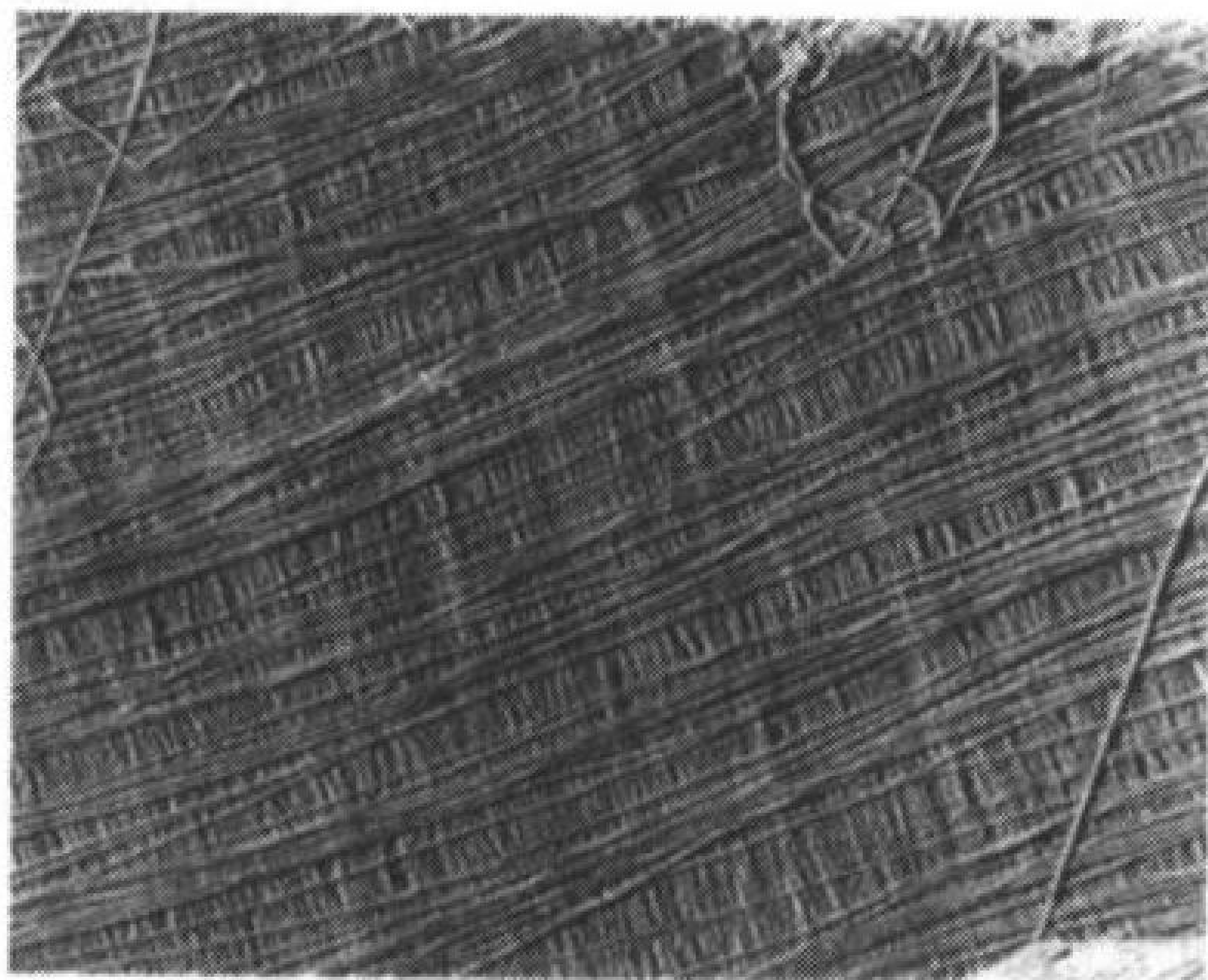


图 8-8 细胞壁的电子显微镜照片

来自藻类 Chaetomorpha 样品细胞壁的纤维素纤维排列成层。(引自 Biophoto Associates/Photo Researchers)

纤维素是由高达 15 000 个 D-葡萄糖残基以 β(1→4)糖苷键相连而成的线性多聚体。根据纤维素纤维的 X 射线研究，Anatole Sarko 提出了如图 8-9 所示的结构。这种高度紧密结合在一起的氢键结构，使纤维素具有异常高的强度和水不溶性，尽管它们有亲水性。在植物细胞壁中，纤维素纤维被含有其他多糖和**木质素**(lignin)的基质包埋，并与之交联。木质素是塑料样酚醛多聚体。由此产生的复合材料能够抵抗大应力，因为基质将应力平均分散在纤维素增强成分之中。

尽管脊椎动物自身并没有水解纤维素 β(1→4)键的酶，但是食草动物的消化道中含有共生微生物，它们能分泌一系列的酶，统称为**纤维素酶**(cellulase)，白蚁也是如此。然而，纤维素的降解是一个缓慢的过程，因为其紧密堆积和氢键键合的聚糖链不容易接触纤维素酶，即使其中的许多糖苷键都已被水解之后，也不容易被分开。所以，奶牛必须咀嚼它们反刍的食物，真菌和其他生物一般要

许多年才能降解枯死的树木。

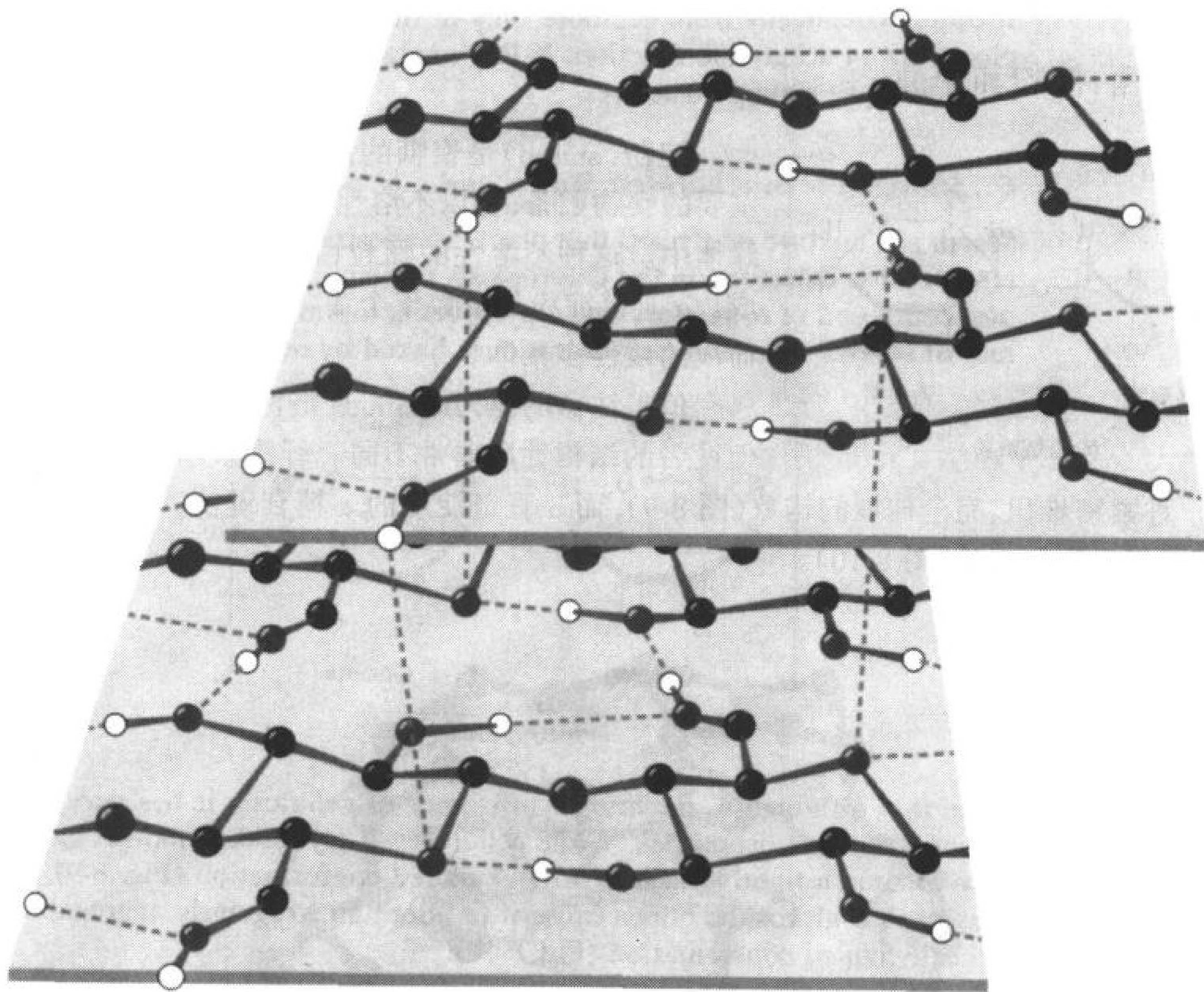
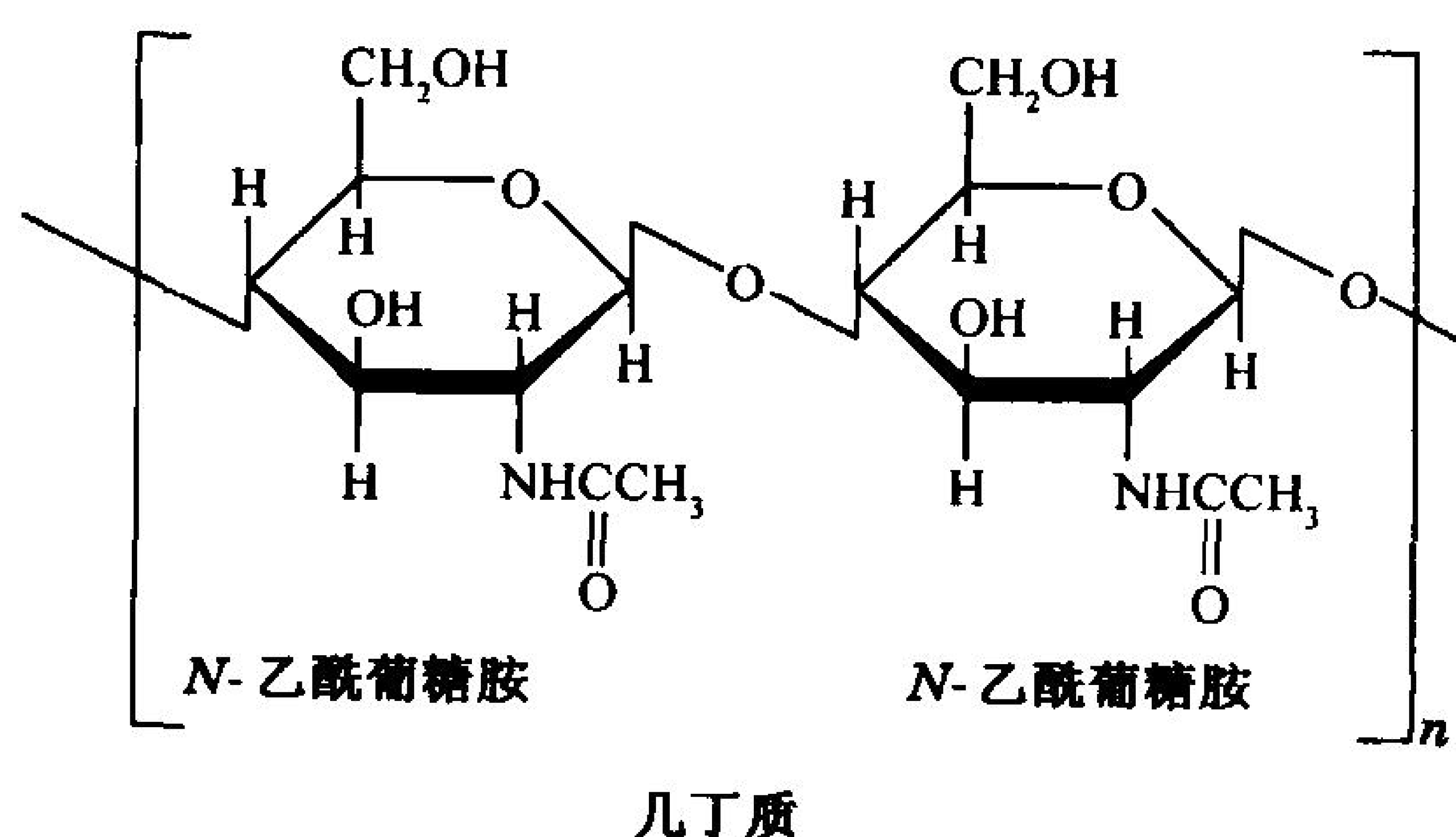


图 8-9 纤维素模型

纤维素纤维由约 40 条平行伸展的聚糖链组成。在每条聚糖链中，以 β(1→4)键相连的每个葡萄糖单元相对于其相邻残基旋转 180°，并通过链内氢键（长虚线）保持这种位置。聚糖链横向排列形成片层，这些片层以葡萄糖单元的一半长度错开，并垂直堆积。整个装配通过分子内氢键加以稳定。为清楚起见，不参与氢键形成的氢原子被省略。

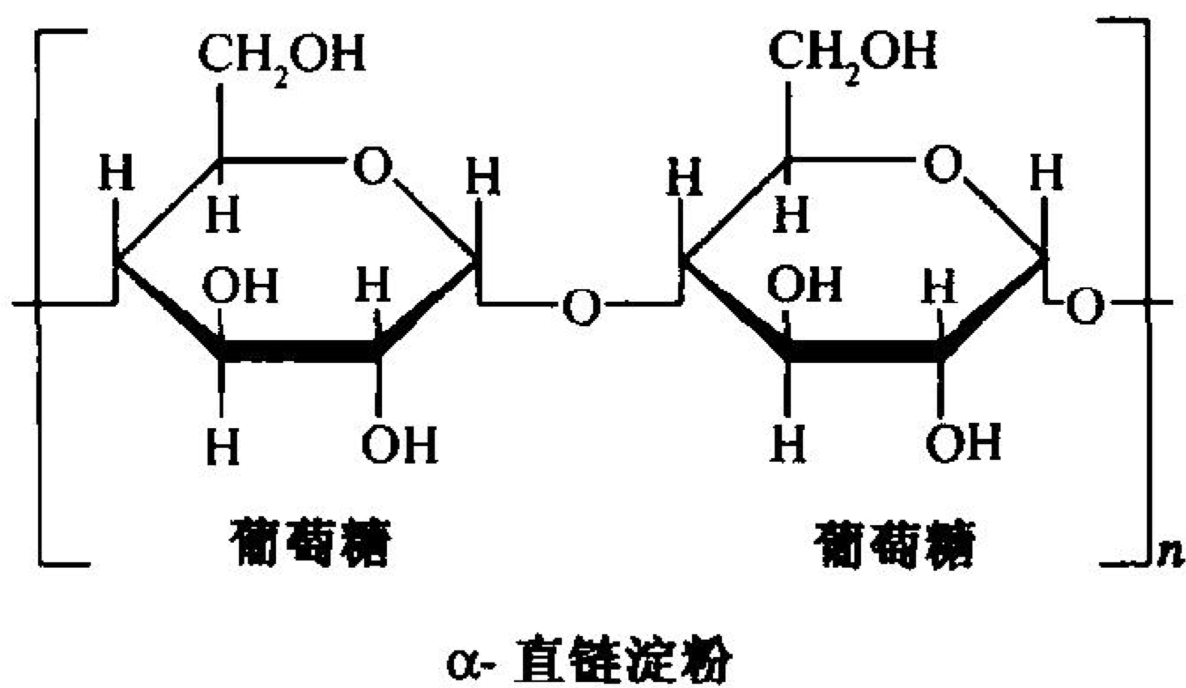
几丁质(chitin)是无脊椎动物如甲壳虫、昆虫和蜘蛛外骨骼的主要结构成分，也存在于大多数真菌和许多藻类的细胞壁中，所以几丁质几乎与纤维素一样丰富。几丁质是 N-乙酰-D-葡糖胺残基以 β(1→4)键相连而成的同聚物。



几丁质

206 在化学上，几丁质与纤维素的区别仅在于每个 C2 的 OH 基已被乙酰胺功能团取代。X 射线分析表明几丁质和纤维素有类似的结构。

C. 贮存多糖：淀粉和糖原



α-直链淀粉

淀粉(starch)是聚糖的混合物，植物合成淀粉作为其主要的食物贮备，它以不溶性的颗粒贮存于植物细胞的叶绿体中。这种不溶性的颗粒由 **α-直链淀粉**和**支链淀粉**组成。α-直链淀粉是由数千个葡萄糖残基以 α(1→4)键相连而成的线性多聚体。

值得注意的是，虽然 α-直链淀粉是纤维素的异构体，但两者的结构性质非常不同。纤维素以 β-糖苷键连结，使之呈现一种紧密堆积、完全伸展的构象(图 8-9)，而 α-直链淀粉的 α-糖苷键使其形成一种不规则聚集的、螺旋盘绕的构象(图 8-10)。

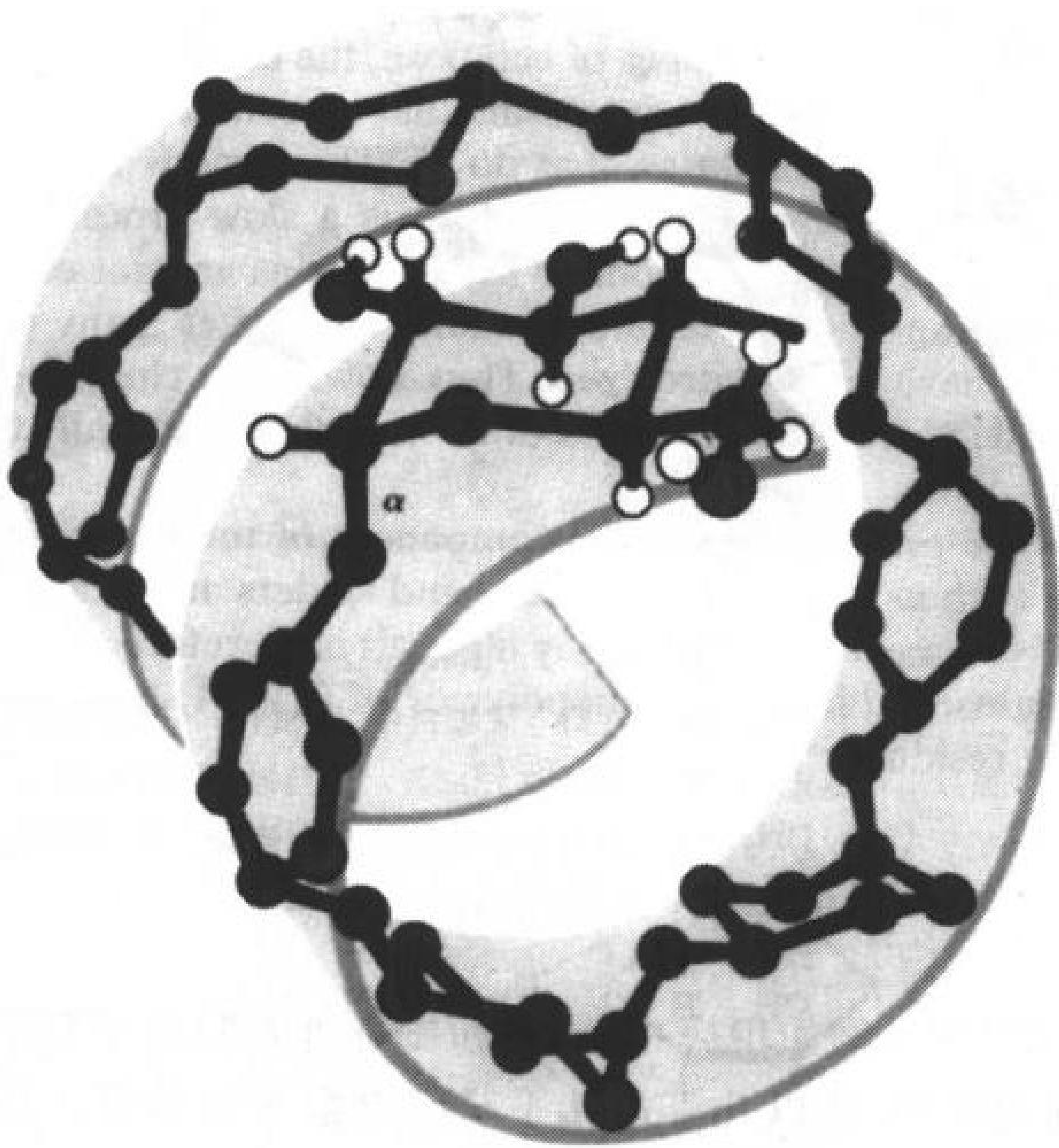
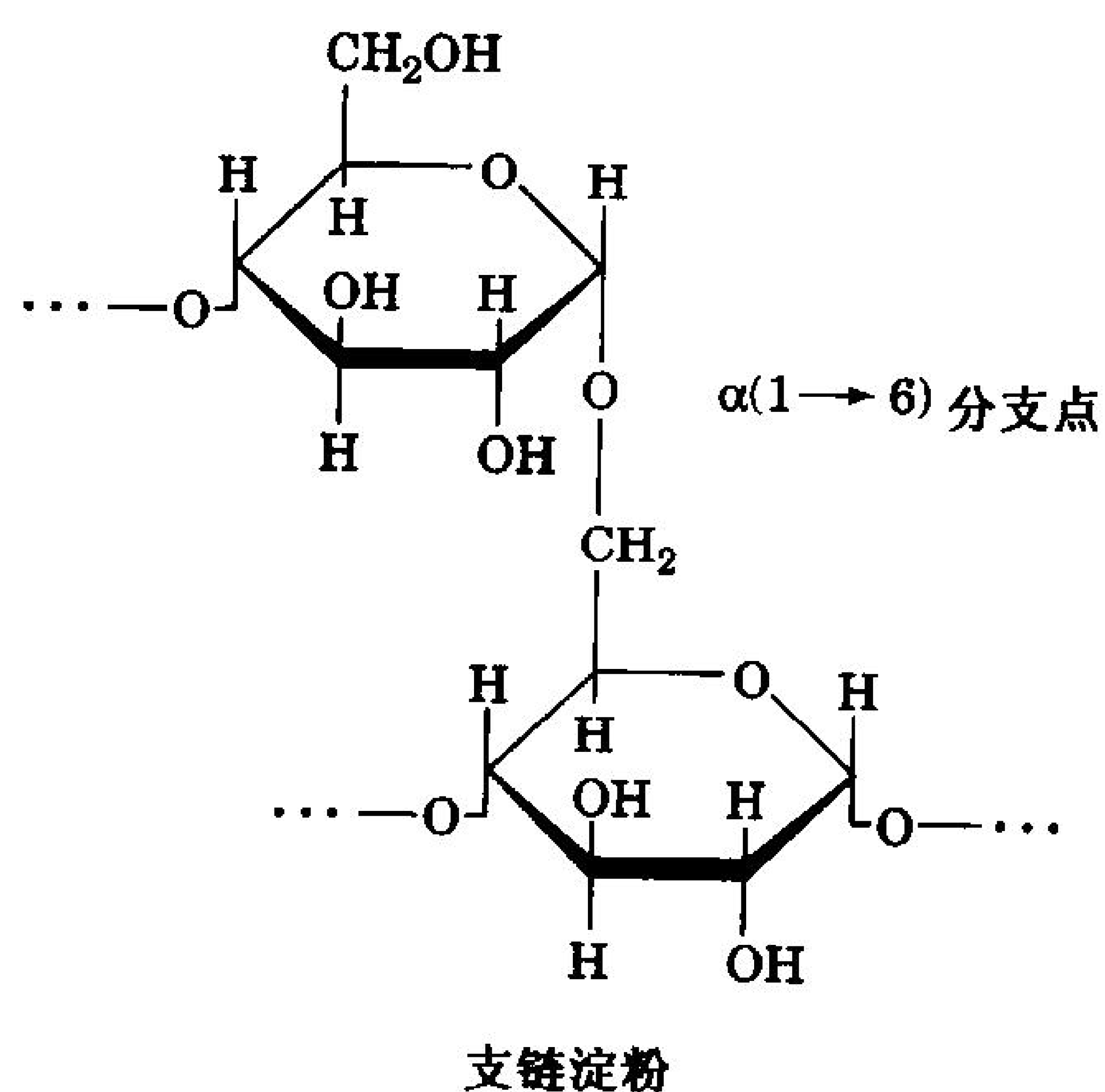


图 8-10 α-直链淀粉

这种规则性重复的多聚体形成左手螺旋。注意，α-直链淀粉的 α(1→4)键转变为纤维素的 β(1→4)键(图 8-9)所引起的结构和性质的巨大差异。(引自 Irving Geis)

支链淀粉由葡萄糖残基主要通过 α(1→4)键连接而成，但是平均每隔 24～30 个葡萄糖残基 207 就会产生一个 α(1→6)键的分支点，因此，支链淀粉是有分支的分子。



支链淀粉

支链淀粉分子含多达 10^6 个葡萄糖残基，成为自然界中最大的分子。大量的葡萄糖以淀粉的形式贮存下来，可以极大地降低因葡萄糖以单体形式存在而导致细胞内的高渗透压，因为渗透压与给定体系中的溶质分子数成正比(节 2-1)。

人类饮食中主要的碳水化合物——淀粉的消化开始于口腔，唾液中含有一种**淀粉酶**(amylase)，它可以随机地水解淀粉中的 α(1→4)糖苷键。在小肠中，淀粉的消化在胰淀粉酶的作用下继续进行，淀粉被降解为由 α(1→4)键相连的二糖(**麦芽糖**)和三糖(**乳三糖**)，以及含有 α(1→6)键分支被称为糊精的寡聚糖。这些寡聚糖由 **α-葡萄糖苷酶**和**脱支酶**继续水解为组成它们的单糖，α-葡萄糖苷酶每次水解一个葡萄糖残基，脱支酶既能水解 α(1→4)键，也能水解 α(1→6)键。水解产生的单糖被小肠吸收后再转运到血液中。

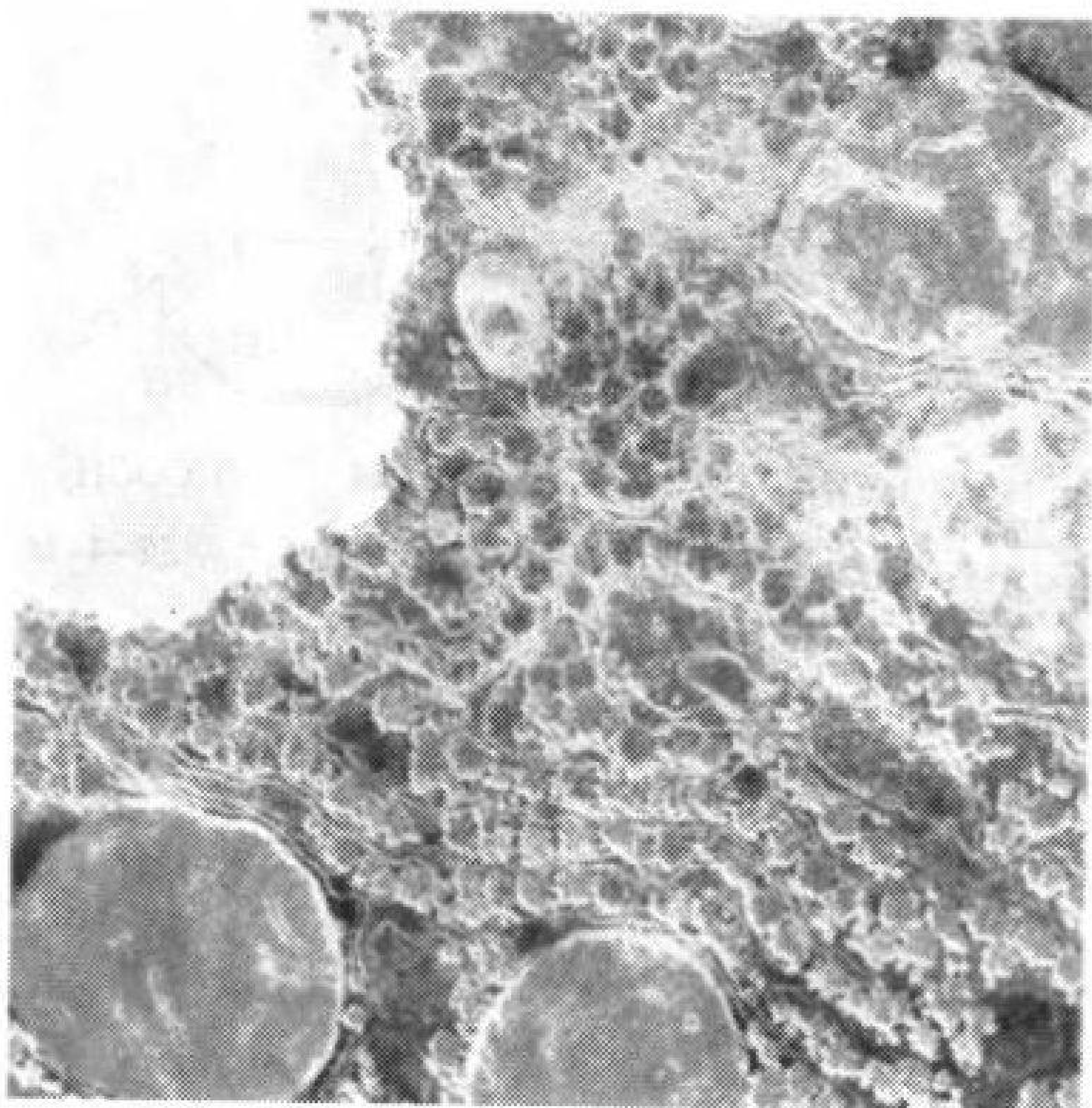


图 8-11 肝脏细胞中糖原颗粒(粉红色)的显微镜照片

绿色是线粒体，黄色是脂肪小球。肝脏中糖原的含量可达其净重的 10%。(引自 CNRI/Science Photo Library/Photo Researchers)

糖原(glycogen)是动物的贮存多糖，存在于所有细胞中，特别是骨骼肌和肝脏细胞中最多，它们以细胞质颗粒的形式存在(图 8-11)。糖原的一般结构与支链淀粉相似，但是糖原的分支更多，大约每隔 12 个残基就有一个分支点。在细胞中，糖原被**糖原磷酸化酶**降解，以供代谢之用，该酶从糖原的非还原端依次向内逐个水解 α(1→4)键。*糖原高度分支的结构，使之具有许多非还原端，因此，能快速调动葡萄糖的产生，以满足代谢所需。*糖原的 α(1→6)分支点可被**糖原脱支酶**水解(糖原的降解将在节 15-1 中进一步讨论)。

D. 糖胺聚糖

在细胞外的空隙中，尤其是结缔组织，如软骨、肌腱、皮肤和血管壁的胞外空隙中含有胶原(节 6-1C)和其他蛋白质，它们包埋在由**糖胺聚糖**(glycosaminoglycan)组成的胶状基质中。这些无分支的聚糖由糖醛酸与氨基己糖相间排列组成。糖胺聚糖的溶液似黏液一般黏稠，这是由它

们的高黏度和高弹性导致。

透明质酸(hyaluronic acid)是组成结缔组织、关节液(润滑关节的液体)以及眼睛中玻璃体的重要的糖胺聚糖。透明质酸分子由 250～25 000 个以 β(1→4)键相连的二糖单元组成，二糖单元又由 D-葡糖醛酸和 ***N*-乙酰-D-葡糖胺**(GlcNAc)以 β(1→3)键相连而成(图 8-12)。透明质酸的二糖单元不断延伸形成一种刚性的分子，其中大量的互斥阴离子结合阳离子和水分子。透明质酸在溶液中的体积约为其固态体积的 1000 倍。

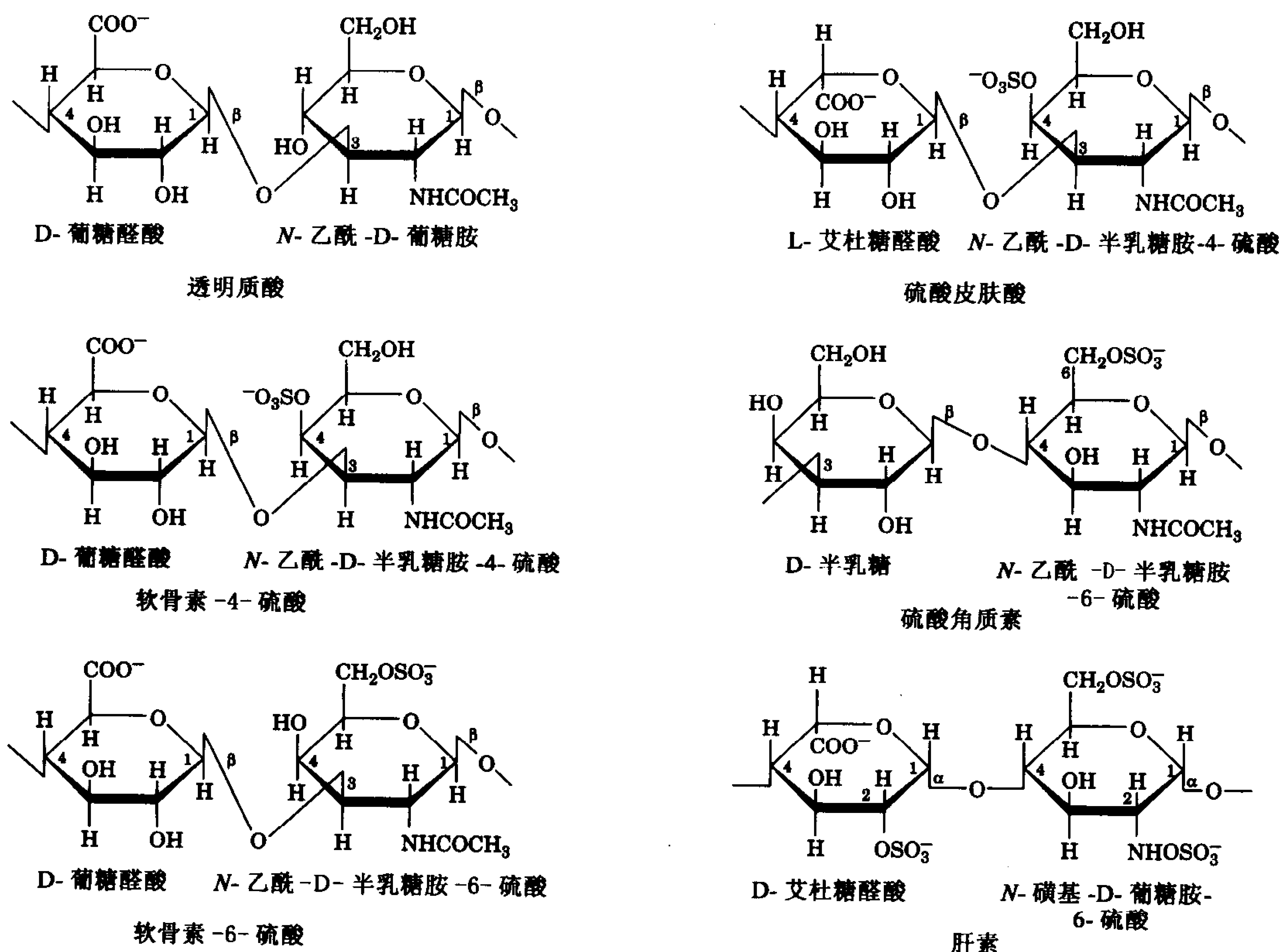


图 8-12　一些糖胺聚糖的二糖重复单元

红色是阴离子基团，蓝色是 N-乙酰氨基基团。

透明质酸溶液具有依赖于切力的黏度(在切变应力作用下，在其作用的对立面产生相等的反向作用力)。在低切力作用下，透明质酸分子形成扭曲团，极大地阻碍其流动，亦即这种溶液是非常黏稠的。随着切变应力的增强，黏稠的透明质酸分子趋于顺流排列，因此阻力变小。透明质酸溶液的这种黏性和弹性使其成为极佳的生物减震剂与润滑剂。

其他常见的含有 50～1000 个硫酸化的二糖单元的糖胺聚糖见图 8-12。**软骨素-4-硫酸**和**软骨素-6-硫酸**的区别仅在于它们的 ***N*-乙酰半乳糖胺**(GalNAc)残基的硫酸化位点不同。**硫酸皮肤素**是从软骨素衍生而来的，软骨素中葡糖醛酸残基上的 C5 通过酶促差向异构生成**艾杜糖醛酸**残基。**硫酸角质素**(不要与节 6-1C 中的纤维性蛋白角蛋白相混淆)是各种糖胺聚糖中最不均一的一种，因为其硫酸含量可变，并含有少量墨角藻糖、甘露糖、*N*-乙酰葡糖胺和唾液酸。**肝素**(heparin)的硫酸化也是可变的，平均每个二糖单元含有 2.5 个硫酸基团，成为哺乳动物组织中最

209

富含电荷的多聚体。

与其他糖胺聚糖不同的是，肝素不是结缔组织的组成成分，但它几乎毫无例外地存在于动脉壁出现的肥大细胞胞内颗粒中。肝素抑制血液的凝固，经损伤而释放的肝素被认为可阻止迁移血块的形成。因此，在临床上肝素被广泛用作抗凝血剂，例如用于手术后病人。

3. 糖蛋白

许多蛋白质实际上是糖蛋白，它们所含碳水化合物的量为<1%～>90%。糖蛋白存在于所有生物中，其功能涵盖天然蛋白质的所有活性，包括酶、转运蛋白、受体、激素以及结构蛋白。与所有蛋白质一样，糖蛋白的多肽链的合成是受基因调控的；相反，它的碳水化合物链则是酶促合成的，并共价连接到多肽链上，并不需要核酸模板的严格指导。因此，糖蛋白倾向于含有多种多样的碳水化合物组分，这种现象称为**微异质性**(microheterogeneity)。

A. 蛋白聚糖

蛋白质和糖胺聚糖在细胞外基质中通过共价和非共价键聚集成一组多样化的大分子，称为**蛋白聚糖**(proteoglycan)。电子显微镜照片(图 8-13a)和其他证据表明蛋白聚糖具有一种瓶刷样的分子结构，其中“刷毛”以非共价键结合在丝状透明质酸骨架上。“刷毛”由**核心蛋白**组成，核心蛋白通常是由硫酸角质素和硫酸软骨素糖胺聚糖共价相连形成(图 8-13b)。较小的寡糖通常在核心蛋白的透明质酸结合位点附近与核心蛋白相连，这些寡糖以糖苷键与蛋白质上特异的天冬酰胺残基的酰胺氮原子连接(因此称为 ***N*-连接寡糖**，节 8-3C)。硫酸角质素和硫酸软骨素链则通过寡糖以糖苷键与核心蛋白中特异的丝氨酸或苏氨酸残基的侧链氧原子共价连接(即 ***O*-连接寡糖**)。

总而言之，一条由透明质酸组成的长度为4000～40 000Å 的中心链可以结合多达 100 个核心蛋白，每个核心蛋白与约 50 条硫酸角质素链和约 100 条硫酸软骨素链相连，每条硫酸角质素链和硫酸软骨素链分别由高达 250 和 1000 个二糖单元组成。这就解释了许多蛋白聚糖的相对分子质量可高达惊人的千百万道尔顿的原因。

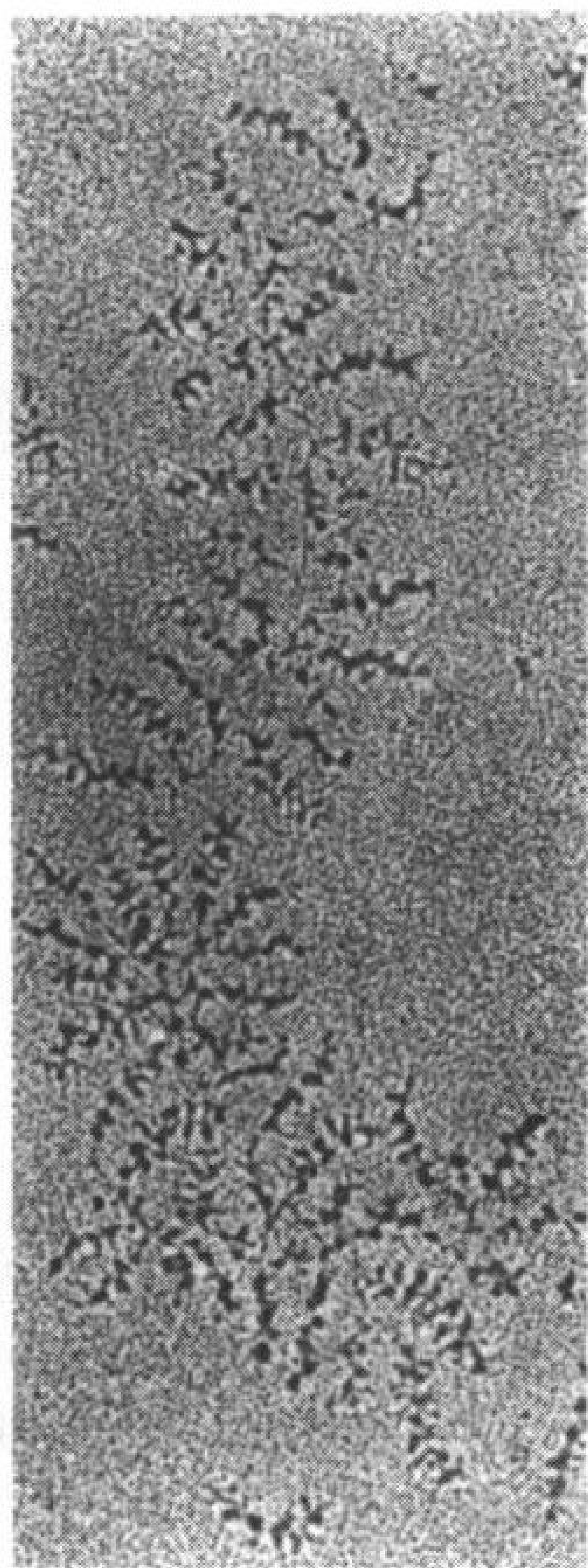
*蛋白聚糖这种伸展的刷状结构及其硫酸角质素和硫酸软骨素组分的多聚负电荷特性，使这些化合物高度亲水。*软骨是由胶原蛋白原纤维形成的网状结构构成，其中充满了蛋白聚糖，具有高度的弹性。在软骨上加压，水从蛋白聚糖的荷电区域中被挤出，直到电荷之间的斥力阻止进一步的压缩；当压力被取消时，水又重新进入蛋白聚糖。缺乏血管的关节中的软骨，靠身体运动造成的液体的流动来滋养，这解释了为什么长时间的不活动会引起软骨变薄、变脆。

210

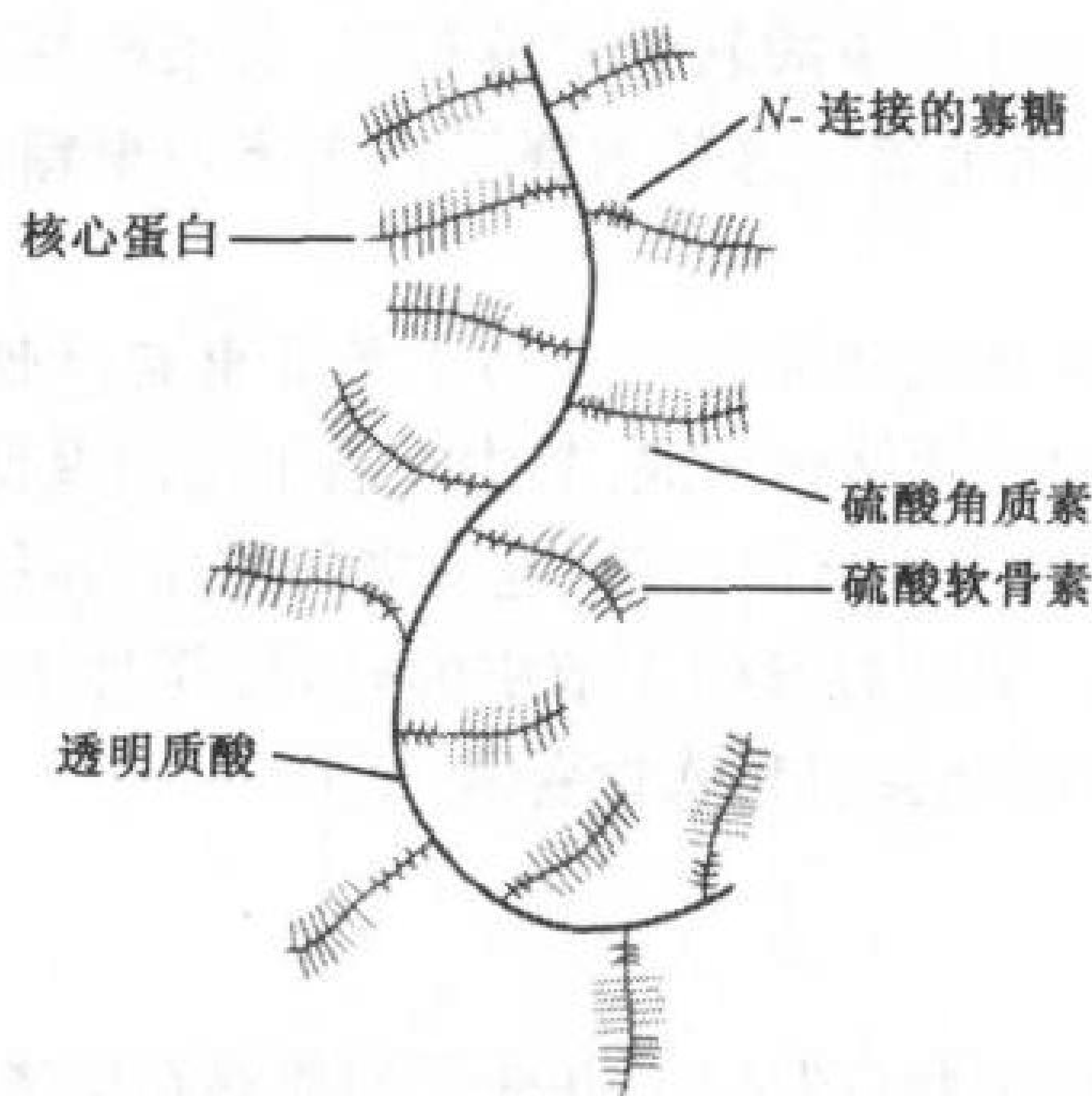
B. 细菌细胞壁

细菌具有坚固的细胞壁(图 1-6)，因此具有独特的形状(图 1-7)，并使它们能够在**低渗**(hypotonic)(低于细胞内盐浓度)环境中生存而不致于因为低渗而导致细胞膨胀直到原生质膜破碎。细菌的细胞壁与细菌的**毒力**(virulence)(致病能力)有关，因此在医学上相当重要。实际上，仅仅注射细菌的细胞壁就可以导致动物表现出许多细菌疾病的症状，而且细菌特异性的抗原就是其细胞壁的组成成分。因此，在动物体内注射细胞壁的制备物通常会激发抵抗细菌的免疫性。

根据是否吸收革兰氏染料，细菌被分类为**革兰氏阳性菌**和**革兰氏阴性菌**(1884 年，Christian



(a)



(b)

图 8-13 蛋白聚糖
(a)电子显微镜照片，显示一条透明质酸的中心链，它支撑着大量的凸出物。[引自 Caplan, A. I., Sci, Am. 251(4), 87(1984)。Copyright © Scientific Americen, Inc. Used by Permission](b)a 中显示的蛋白聚糖的瓶刷模型。大量的核心蛋白非共价连接到透明质酸中心链上，每个核心蛋白有 3 个糖类结合区。

Gran 建立了一种染色法：加热固定细胞，接着用染料龙胆紫和碘处理，然后再用乙醇或丙酮脱色）。革兰氏阳性菌（图 8-14a）有一层厚的细胞壁（约 250Å）包围着它们的原生质膜，而革兰氏阴性菌（图 8-14b）则有一层薄的细胞壁（约 30Å），且被一层复合外膜所包裹，这层外膜部分隔绝了对细菌有毒性物质的入侵，包括革兰氏染料。这就解释了革兰氏阴性菌比革兰氏阳性菌对抗菌素具有更强抗性的现象。

细菌的细胞壁由共价连接的多糖和多肽链组成，形成一个袋状大分子，完全包裹整个细胞。这种框架的结构主要是由 Jack Strominger 阐明的，被称为**肽聚糖**(peptidoglycan)。肽聚糖的多糖组分是由 GlcNAc 和 ***N*-乙酰胞壁酸**（拉丁文：Murus, wall）相间排列，通过 β(1→4) 键连接而成的线性链。*N*-乙酰胞壁酸的乳酸基团与含有 D-氨基酸的四肽形成酰胺键，构成肽聚糖的重复单元(图 8-15)。平行排列的肽聚糖链通过它们的四肽侧链彼此交联。

金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）的四肽序列为：L-丙氨酸-D-异谷氨酰胺-L-赖氨酸-D-丙氨酸，交联由一条五甘氨酸链从四肽羧基末端延伸至相邻四肽赖氨酸的 ε-氨基构成。细菌细胞壁由数层同中心层组成，这些同中心层很可能三维交联。革兰氏阳性菌的细胞壁也有用于保护细胞的额外的多糖衍生物。

蛋白质水解酶大多对 L-氨基酸具有专一性，所以肽聚糖中的 D-氨基酸使其对蛋白水解酶具有抗性。然而，存在于眼泪、黏液和其他体液以及蛋清中的**溶菌酶**(lysozyme)可以催化 *N*-乙酰胞壁酸与 *N*-乙酰葡糖胺之间 β(1→4) 糖苷键的水解（溶菌酶的结构和机制将在节 11-4 中详细阐述）。抗菌素也能破坏细胞壁，例如，青霉素可以抑制细菌细胞壁的生物合成（见框 8-2）

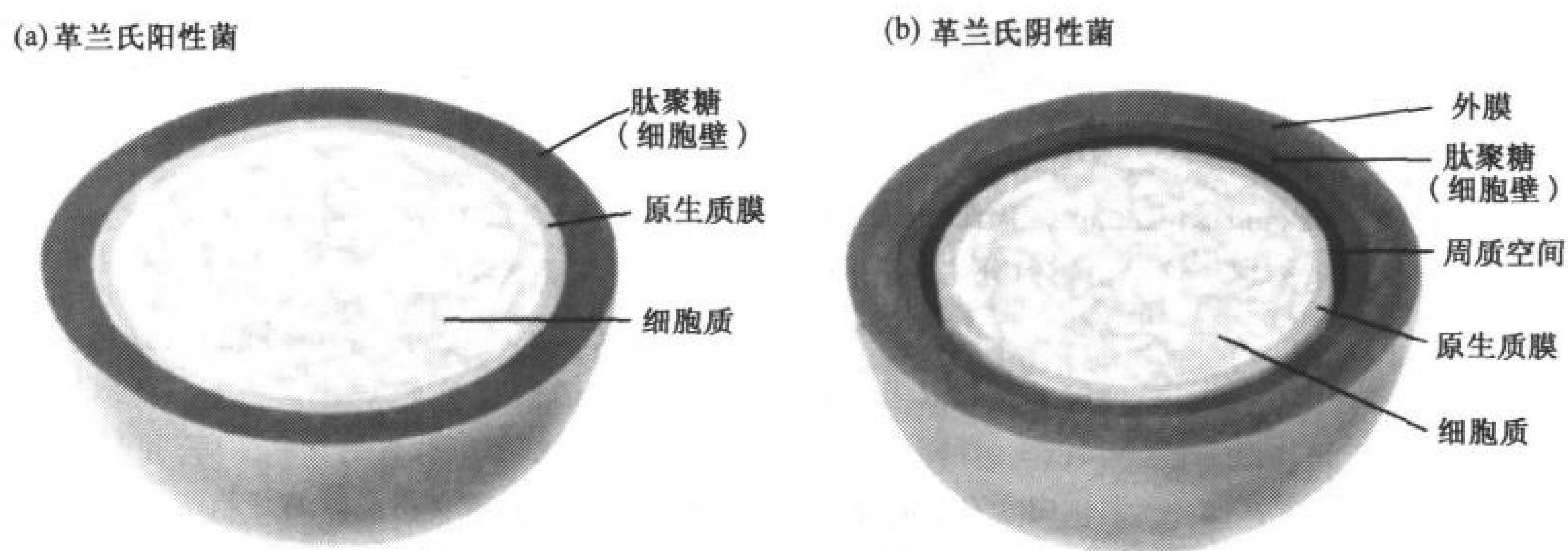


图 8-14 细菌细胞壁

此示意图比较了(a)革兰氏阳性菌和(b)革兰氏阴性菌的细胞被膜。

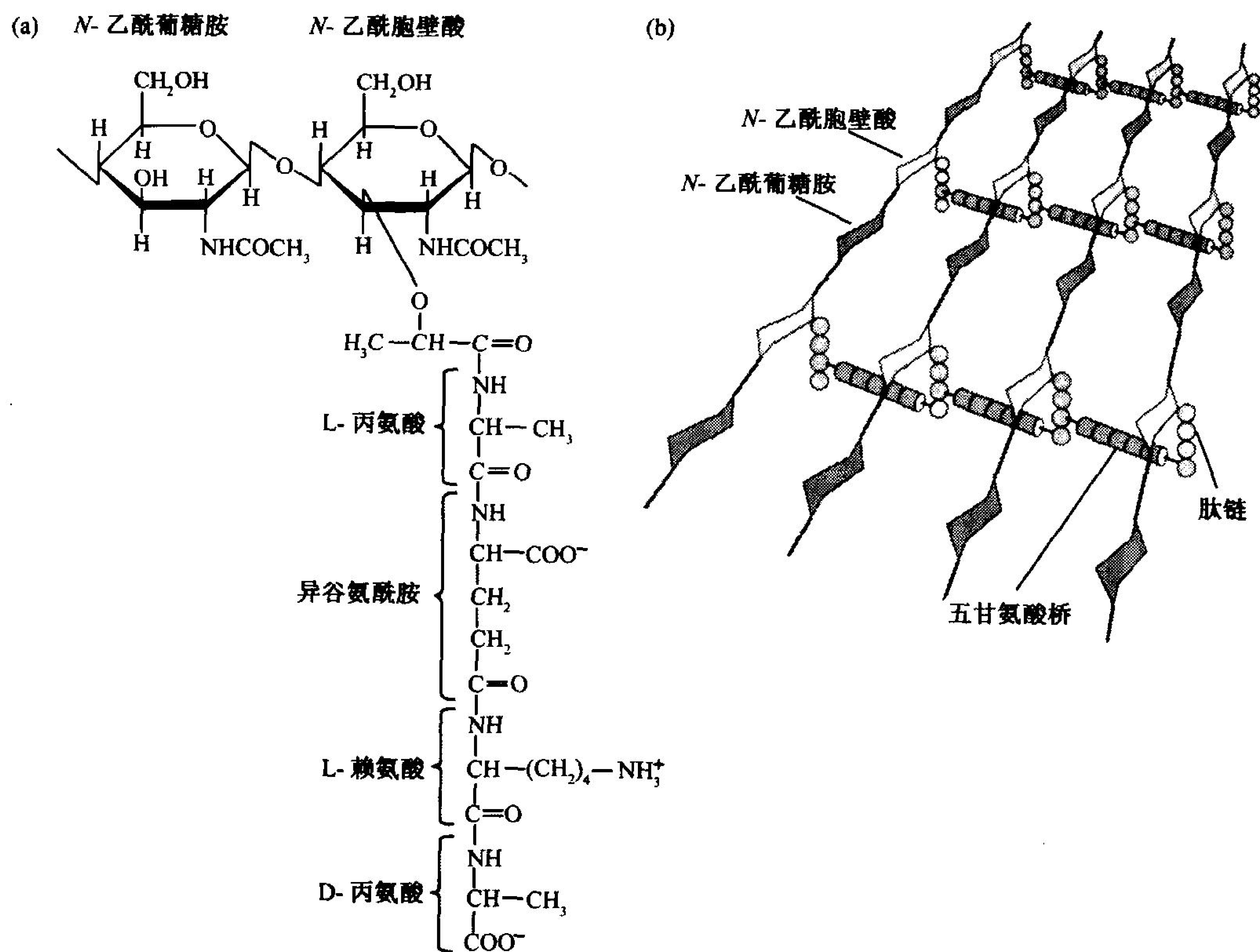


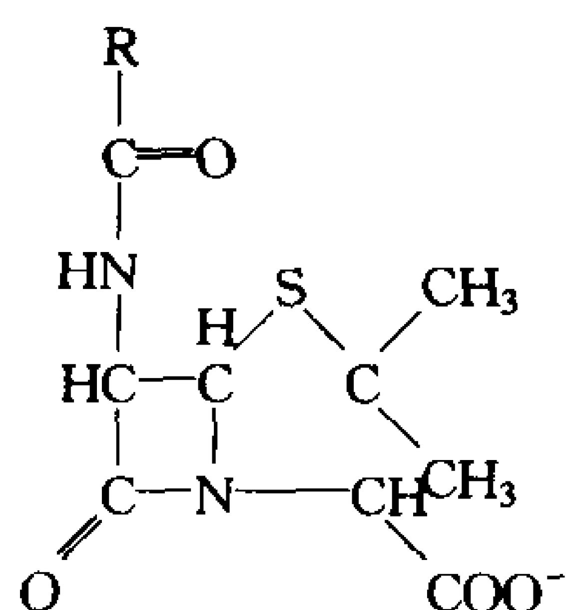
图 8-15 肽聚糖

(a)肽聚糖的重复单元是 N-乙酰葡糖胺-N-乙酰胞壁酸二糖，其 2-羟丙酰基侧链与四肽形成酰胺键。图中给出的是金黄色葡萄球菌的四肽，选用异谷氨酰胺是因为它通过 γ-羧基形成肽键。(b)金黄色葡萄球菌细胞壁的肽聚糖，它的五甘氨酸连接桥(紫色)如图所示。

框 8-2 健康和疾病的生物化学

青霉素

1928 年，Alexander Fleming 注意到细菌培养平板偶然被霉菌青霉 *Penicillinum notatum* 污染后，霉菌附近的细菌被裂解。这是由霉菌分泌的一种抗菌素——青霉素导致的。



青霉素

青霉素含有一个与β-内酰胺环(蓝色)融合的噻唑环(红色)，一个可变的 R 基团通过肽键与β-内酰胺环相连。

青霉素专一性结合催化细菌细胞壁肽聚链交联的酶，并使其失活。由于在生长中的细胞，细胞壁的扩张需要将坚固的细胞壁打开，以插入新的细胞壁物质，所以将正在生长的细菌暴露于青霉素中会导致细胞裂解。然而，人类没有与青霉素专一结合的酶，所以青霉素对人类没有毒性，因此可用于治疗。

大多数抗青霉素的细菌分泌青霉素酶，通过切断青霉素的β-内酰胺环中的酰胺键而使其失活。可是，人们发现青霉素酶的活性因青霉素中 R 基团的性质而改变，由此推动了半合成青霉素的开发，例如，氨苄青霉素、氨苄青霉素的 R 基团是氨基苯[$—CH(NH_2)C_6H_5$]基团，而非苯甲基。在临床上，这类抗菌素通常能有效地治疗耐青霉素细菌菌株引起的疾病。

212

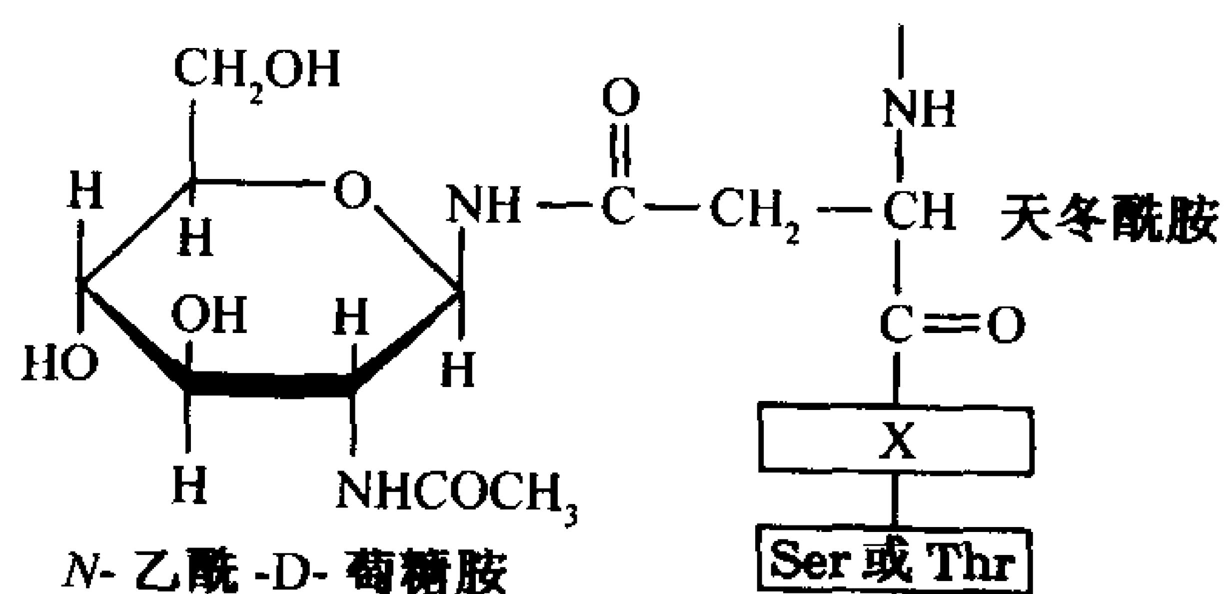
C. 糖基化蛋白

真核细胞的几乎所有分泌性蛋白和膜蛋白都是**糖基化**(glycosylated)的，寡糖通过 *N*-糖苷键或 *O*-糖苷键共价结合到蛋白质上。

N-连接的寡糖

在 N-连接的寡糖中，GlcNAc 总是以β-键与存在于天冬酰胺-X-丝氨酸或天冬酰胺-X-苏氨酸序列中的天冬酰胺残基的酰胺氮原子相连，X 表示除脯氨酸和天冬氨酸之外的任何氨基酸。

N-糖基化是**共翻译性**的，即在多肽链合成的过程中进行糖基化。含有 *N*-连接寡糖的蛋白质先被糖基化，然后再被**加工**，其机制主要由 Stuart Kornfeld 阐明(图 8-16)：



1) 含有 9 个甘露糖残基、3 个葡萄糖残基和 2 个 GlcNAc 残基的寡糖结合于正在合成的肽链的天冬酰胺上。肽链由结合在内质网上的核糖体合成(节 10-2D)。
2) 在加工过程中一些糖被去除。加工开始于内质网腔(内腔)，并在高尔基体中继续进行(图 1-8)。酶促修饰由葡糖苷酶和甘露糖苷酶完成。

213

3) 另外的单糖残基，包括 GlcNAc、半乳糖、果糖和唾液酸由高尔基体中的专一性**糖基转移酶**加上去。

14 个残基的寡糖结合于多肽的天冬酰胺上

● N- 乙酰葡糖胺
▼ 甘露糖
▲ 半乳糖
◆ 葡萄糖
唾液酸
L- 墨角藻糖

多肽

单糖单元的去除和葡糖胺的增加，产生（甘露糖）$_3$(GlcNAc)$_2$ 寡糖。在所有 N- 连接的寡糖中都发现有这种（甘露糖）$_3$(GlcNAc)$_2$ 的核心

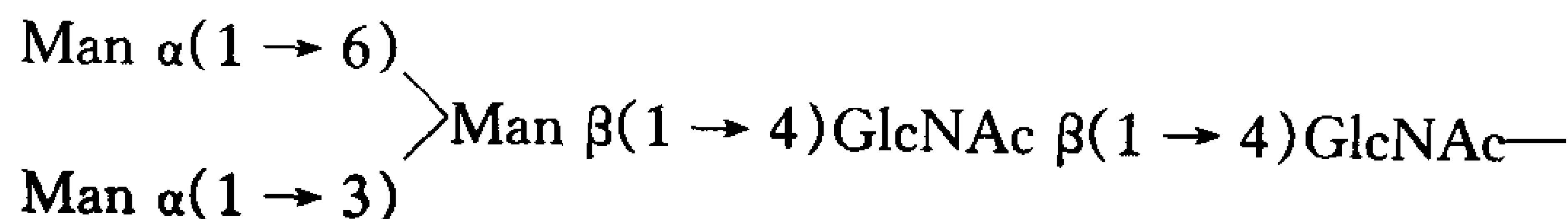
核心寡糖

进一步修饰，增加其他糖类，产生多种多样的 N- 连接的寡糖

图 8-16　N-连接寡糖的合成

(甘露糖)$_9$(葡萄糖)$_3$(GlcNAc)$_2$ 寡糖的增添是在单糖去除之后，由糖苷酶催化完成。其他单糖的增添由糖苷转移酶催化。核心五糖存在于所有 N-连接的寡糖中。[引自 Kornfeld, R. and Kornfeld, S., Annu. Rev. Biochem. 54, 640(1985)]

N-连接寡糖加工的确切步骤，因糖蛋白的性质和细胞中糖苷内切酶的不同而异，但是所有 N-连接的寡糖都有如下所示的核心寡糖结构：



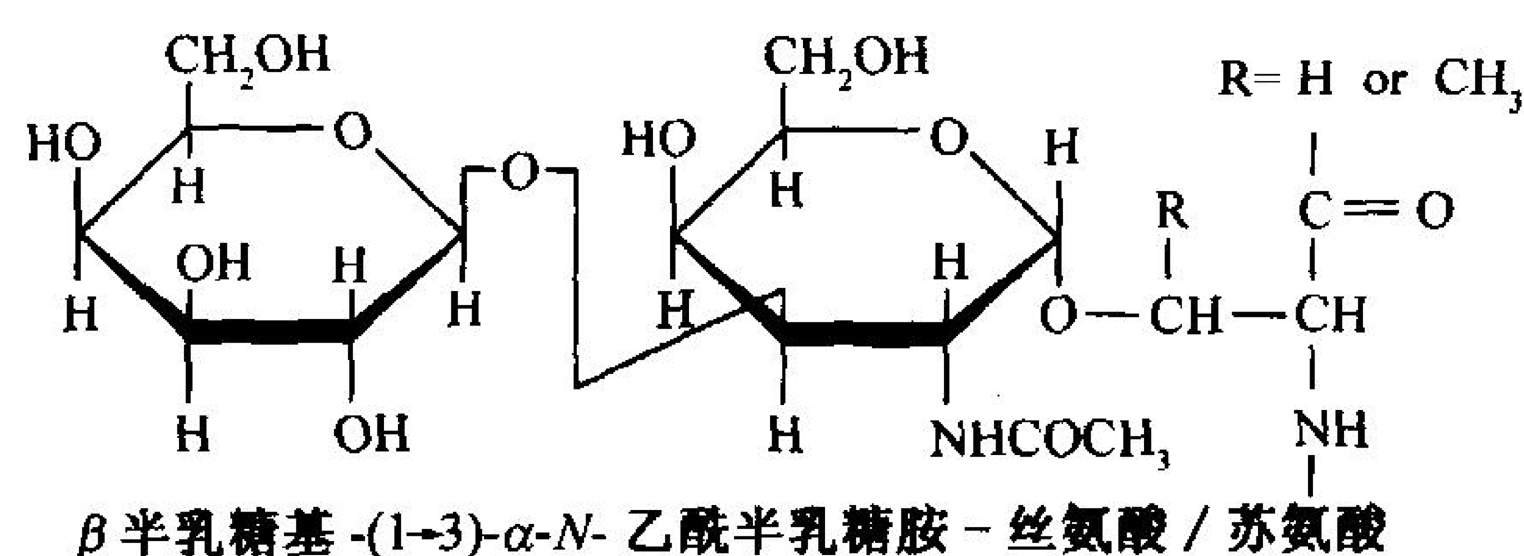
$$\left.\begin{array}{l}\text{Man }\alpha(1\rightarrow 6)\\ \text{Man }\alpha(1\rightarrow 3)\end{array}\right\rangle \text{Man }\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc }\beta(1\rightarrow 4)\text{GlcNAc—}$$

214

有些糖蛋白的加工简单，只产生富含甘露糖的寡糖；而另一些糖蛋白则通过多种加工，产生含数种糖类残基的大寡糖。*在 N-连接的糖蛋白中存在着极大的多样性*。实际上，即使是含有特定多肽链的糖蛋白，也显示出相当大的微观不均一性，推测这是不完全糖基化以及糖苷酶和糖基转移酶缺乏绝对专一性的结果。

O-连接的寡糖

最常见的 O-糖苷连接涉及二糖核心 β-半乳糖基-(1→3)-α-N-乙酰半乳糖胺，该二糖核心与丝氨酸或苏氨酸的 OH 基相连。



*β*半乳糖基-(1→3)-*α*-*N*-乙酰半乳糖胺－丝氨酸／苏氨酸

半乳糖、甘露糖和木糖与丝氨酸或苏氨酸形成 O-糖苷键较少见。半乳糖也可以与胶原蛋白（节 6-1C）中的 5-羟基赖氨酰残基形成 O-糖苷键。O-连接的寡糖的大小从胶原蛋白中的 1 个半乳糖残基到蛋白聚糖中的多至 1000 个二糖单元不等。

O-连接的寡糖在高尔基体中通过单糖单元的逐个增加到已合成好的多肽链上而被合成。合成起始于 GalNAc 被转运到多肽链的丝氨酸或苏氨酸残基上。N-连接的寡糖被转运到特定的氨基酸序列中的天冬酰胺上；可是 O-糖基化的丝氨酸或苏氨酶残基并不是任何共同序列的组分，糖基化的位点由多肽链的二级或三级结构决定。通过相应的糖基转移酶逐步增加单糖，继续 O-糖基化。寡糖合成的能量学和酶学将在节 15-5 中进一步讨论。

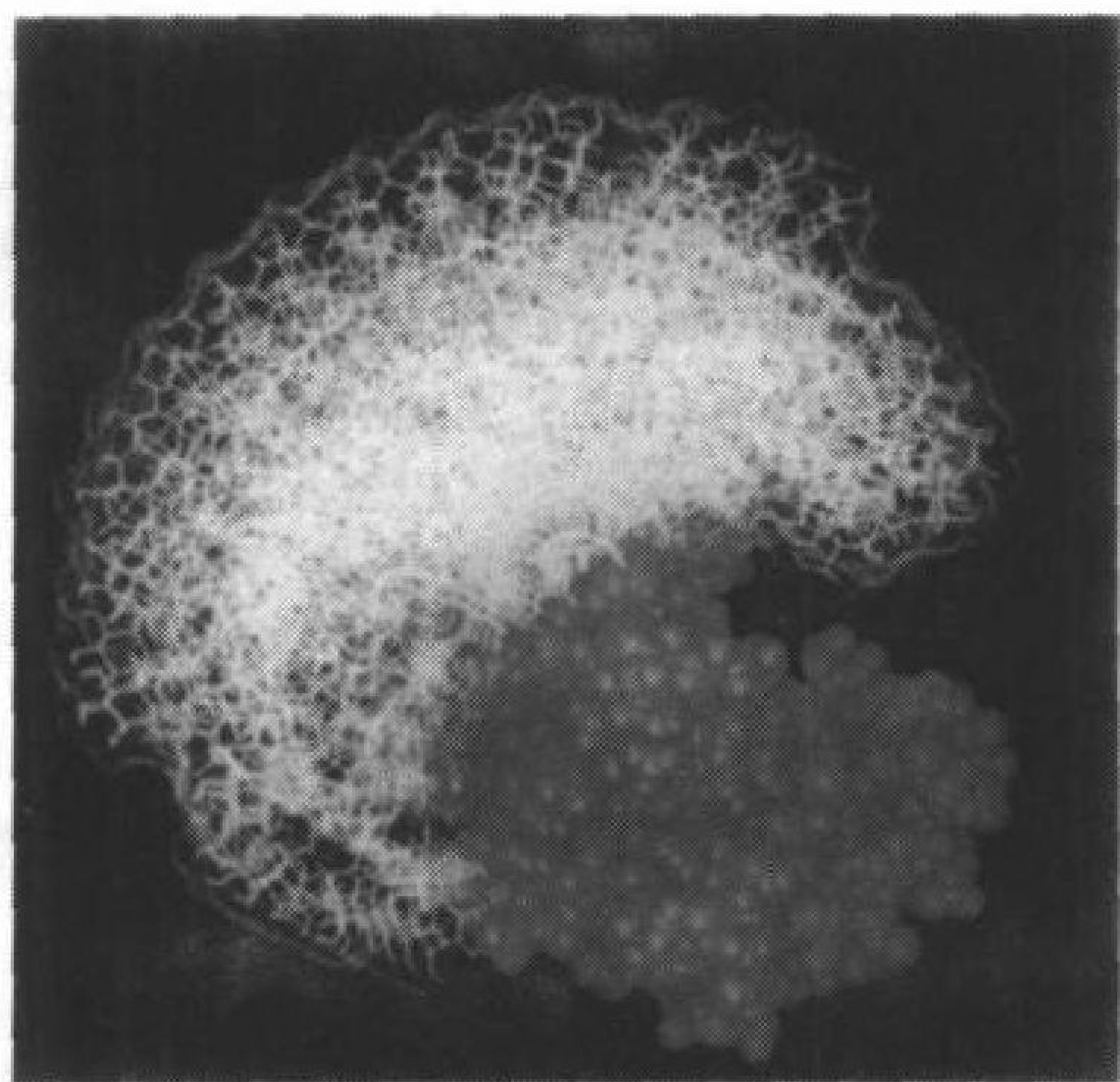


图 8-17　寡糖动力学模型

重叠快照显示出结合在牛胰核糖核酸酶 B（紫色）上的（GlcNAc）$_2$（甘露糖）$_{5\sim9}$寡糖（黄色）的允许构象。（引自 Raymond Dwek, Oxford University, U.K.）

D. 寡糖的功能

虽然同一种糖蛋白的不同分子在共价连接碳水化合物的数量、序列和连接位点上可能不同（一种糖蛋白的变种称为其**糖型**（glycoform）），但是单个蛋白质仍可能含有好几条 N-和 O-连接的寡糖链。这种不均一性使得确定寡糖链各自的生物学功能变得困难。事实上，由缺少特定寡糖加工酶的细胞所合成的糖蛋白，仍显示正常的功能，尽管它们的糖基化不正常，或无糖基化。可是，在其他情况下，糖基化可以影响蛋白质的结构、稳定性和活性。

寡糖的结构效应

寡糖通常在蛋白质形成表面环或转角的序列处和蛋白质连接。糖类是亲水性的，因此寡糖倾向于突出在蛋白质的表面上。然而，一些寡糖

215

可能通过限制与它们连接的多肽链的构象自由度而起结构性作用(回忆一下,*N*-连接的寡糖是在蛋白质确定其最终折叠形状前,即在合成过程中被加上去的)。*O*-连接的寡糖通常成簇聚集在蛋白质高度糖基化的区段上,可能有助于多肽链的稳固和延伸。

因为碳水化合物链在构象上通常是易变的,所以结合在蛋白质上的寡糖占有相当大的时间平均体积(图 8-17)。寡糖以这种方式遮住蛋白质的表面,很可能改变其活性或者保护其免遭蛋白酶的降解。

寡糖介导识别事件

碳水化合物能够以多种可能的方式连接在一起,形成支链结构,这使它们比大小类似的核酸或蛋白质具有携带更多生物信息的潜力。例如,两种不同的核苷酸只能形成两种不同的二核苷酸,但是两种不同的己糖却能够以 36 种不同方式连接在一起(尽管在自然界中不是所有可能的连接方式都必定是现实的)。

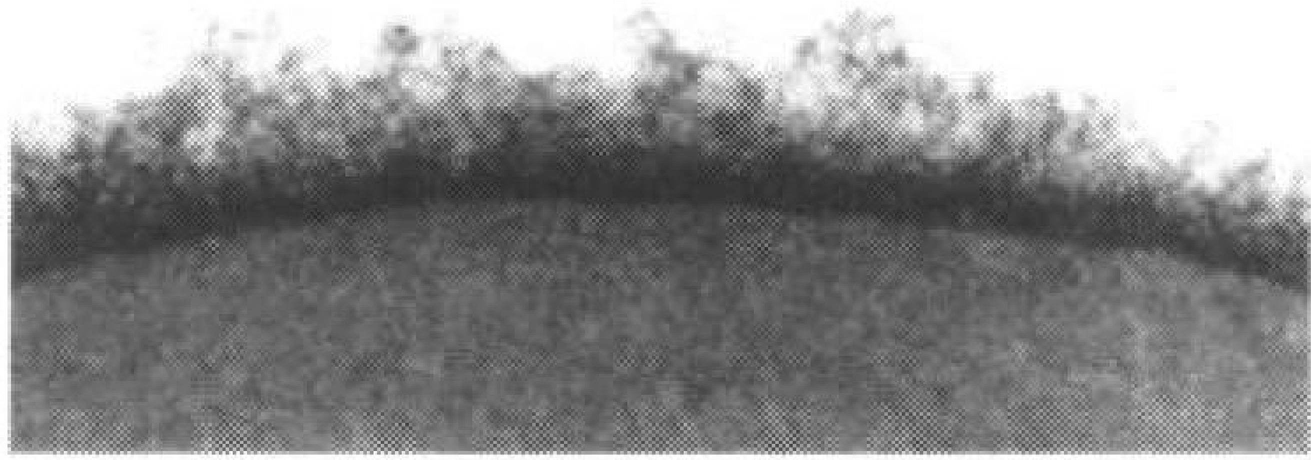


图 8-18　红细胞表面的电子显微镜照片

厚达 1400Å 的碳水化合物层称为糖萼,由紧密包装的寡糖结合细胞表面的蛋白质和脂类组成。(引自 Harrison Latta, UCLA)

碳水化合物独特的结合功能涉及细胞间的信息传递,第一个证据源于所有细胞都被糖以**复合糖**(glycoconjugate)的形式覆盖,例如,糖蛋白和糖脂。在某些细胞中,复合糖中的寡糖形成厚达 1 400Å 的绒毛状层(图 8-18)。

细胞表面的碳水化合物具有识别功能的另一证据来自**凝集素**(lectin)(结合了碳水化合物的蛋白质)。凝集素广泛存在于自然界中,常出现在细胞表面。凝集素具有极高的专一性:它们能够识别寡糖中与其他糖类特定相连的个别单糖(这一特性使凝集素成为实验室中分离糖蛋白和寡糖的有用工具)。蛋白质-碳水化合物相互作用的典型特征(图 8-19)是广泛的氢键(通常包括桥联的水分子)和疏水性糖类表面对芳香族侧链范德华包装。

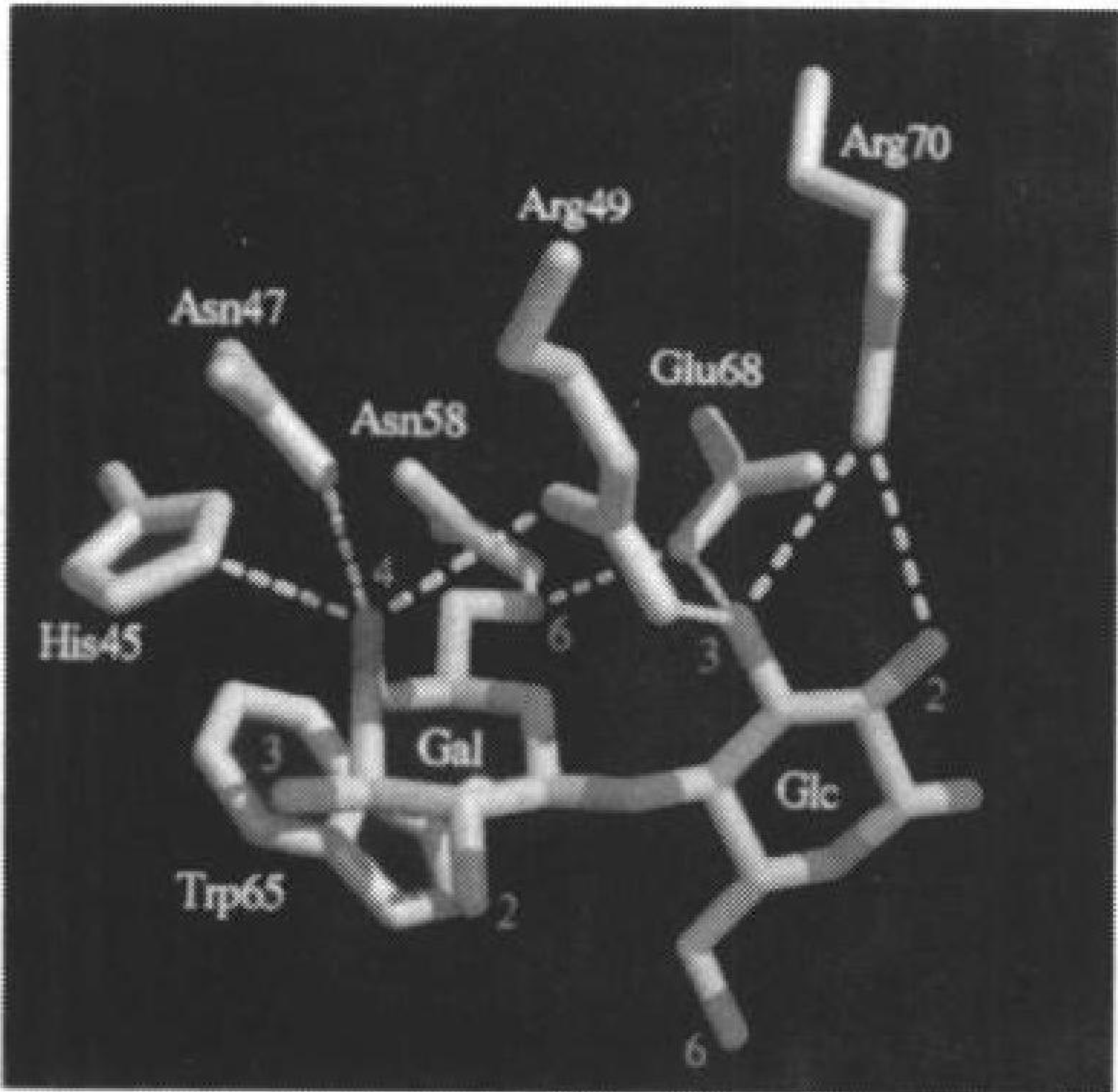


图 8-19　与凝集素结合的碳水化合物

人 galectin-2 主要通过其半乳糖残基与 β-半乳糖苷结合,例如和乳糖结合。半乳糖和葡萄糖残基显示为绿色(含有红色的氧原子),凝集素的氨基酸侧链为蓝色,在侧链和糖残基之间形成的氢键为黄色虚线。(引自 Hakon Leffler, University of California at San Francisco)

细胞表面的碳水化合物是最广为人知的免疫化学标志。例如,**ABO 血型抗原**是存在于个体细胞(不仅仅是红细胞)表面糖脂中的寡糖组分。具有 A 型细胞的个体在其细胞表面具有 A 抗原,在血液中有抗 B 抗体;B 型个体含有 B 抗原,携带抗 A 抗体;AB 型个体同时含有 A 和 B 抗原,既不携带抗 A 抗体也不具有抗 B 抗体;O 型个体不含有任何抗原,但携带抗 A 和抗 B 抗体。

216

因此,将 A 型血输给 B 型个体,会导致抗 A 抗体-A 抗原反应,从而使输入的红细胞凝集(成群聚集在一起),这通常导致致死性的血管堵塞。

表 8-1 列出了在 **A、B** 和 **H 抗原**(O 型个体含有 H 抗原)中发现的寡糖。这些抗原位于糖脂中寡糖组分的非还原末端,H 抗原是 A 抗原和 B 抗原的前体寡糖。A 型个体含有一个由 303 个氨基酸残基组成的糖基转移酶,该酶专一地将 GalNAc 残基加到 H 抗原的末端;B 型个体的糖基转移酶有四个氨基酸残基与 A 型个体不同,因此在 H 抗原末端加上的是一个半乳糖残基;这种糖基转移酶在 O 型个体中是无活性的,因为该酶的合成在第 115 位残基处终止。

表 8-1 红细胞中 A、B 和 H 抗原决定簇的结构

类型	抗原[a]
H	Galβ(1 → 4)GlcNAc ··· ↑1,2 L-Fucα
A	GalNAcα(1 → 3)Galβ(1 → 4)GlcNAc ··· ↑1,2 L-Fucα
B	Galα(1 → 3)Galβ(1 → 4)GlcNAc ··· ↑1,2 L-Fucα

[a] Gal, 半乳糖;GalNAc, *N*-乙酰半乳糖胺;GlcNAc. *N*-乙酰葡糖胺;L-Fuc, L-墨角藻糖。

细胞表面的碳水化合物也介导细胞-细胞的结合事件(见框 8-3)。其他依赖于蛋白质-碳水化合物相互作用的胞内和胞外过程包括如下:

217

1)新合成的定位于**溶酶体**(lysosome)(含有各种水解酶的细胞器,其功能是作为细胞内的再循环中心)的蛋白质含有 *N*-连接的寡糖,该寡糖含有**甘露糖-6-磷酸**残基。位于高尔基体中的甘露糖-6-磷酸受体选择这些蛋白质,将它们转运给溶酶体。

2)失去末端唾液酸(或唾液酸和半乳糖)残基的血循环中的糖蛋白,由肝细胞选择性地从血液中清除。肝细胞识别并和新暴露出的半乳糖残基(或 GlcNAc)结合。因此,对于一定的糖蛋白,其糖型的范围很可能决定了它在血液中的寿命长短。

3)癌细胞和非癌细胞的表面碳水化合物的分布存在很大的差异,这也许与癌细胞的生长失控有关。正常细胞在它们彼此接触后就停止生长,这种现象称为**接触抑制**(contact inhibition)。可是,癌细胞则不受这种控制,因此形成**恶性肿瘤**。

4)哺乳动物的精子识别卵子外层的一种糖蛋白,精子蛋白识别 GlcNAc 或半乳糖残基似乎是介导受精所必需的结合和活化事件。

框 8-3 生物化学焦点

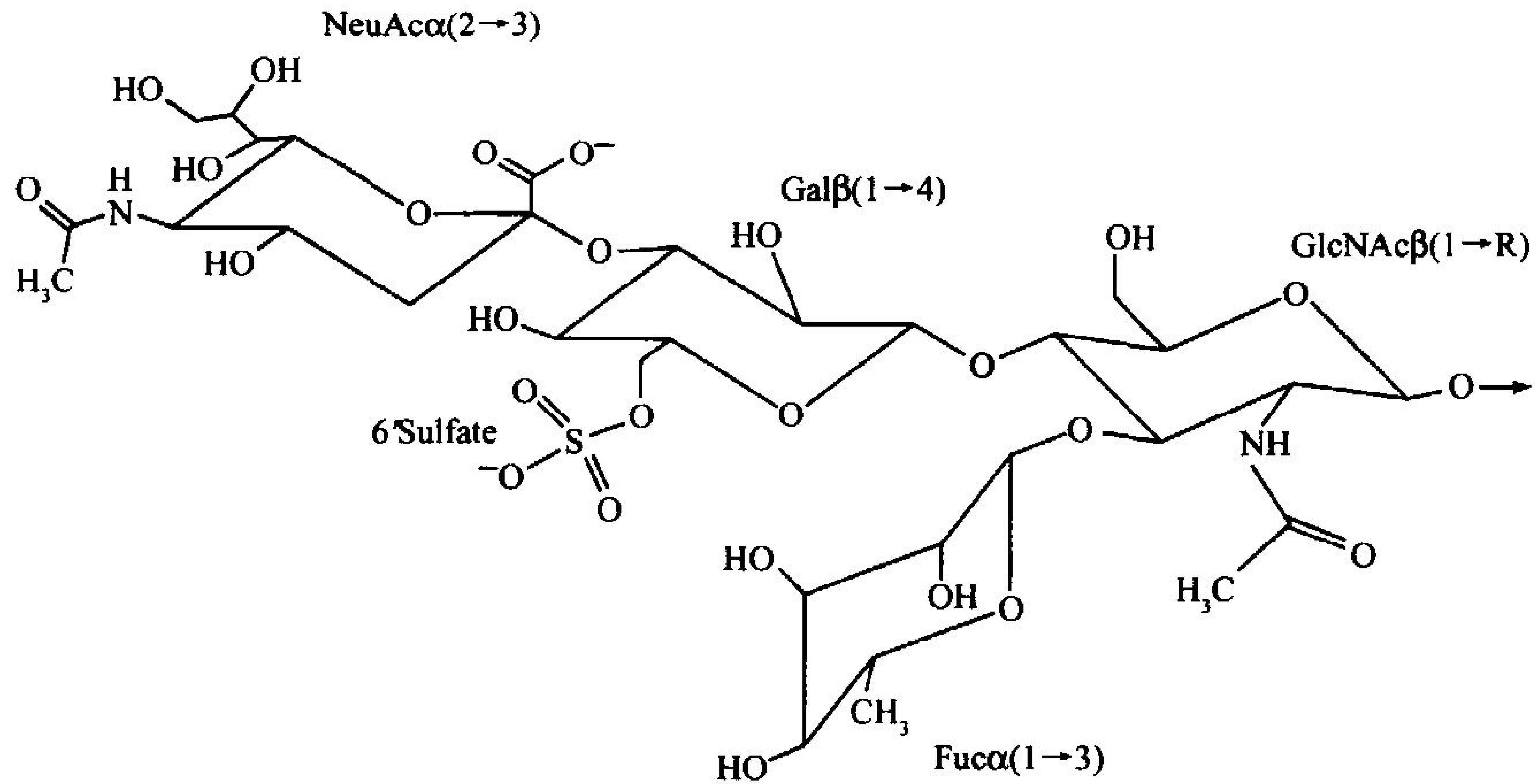
选择蛋白和细胞-细胞相互作用

白细胞是白血细胞,在进入因感染或机械损伤而受损的组织之前,白细胞在血液中循环。白细胞在细胞之间迁移,到达损伤部位之前,为了离开血液循环,白细胞必须附着在内皮细胞(沿血管排列的细胞)的表面。

白细胞与内皮细胞之间的初始结合需要被称为选择素的蛋白质,以及它们的糖蛋白配体。白细胞

在其表面组成型(持续)地表达选择蛋白,而内皮细胞对组织损伤作出反应则瞬时表达它们自己的选择蛋白。

所有的选择蛋白识别并结合到具有原型寡糖结构的细胞表面的糖蛋白上:



白细胞与内皮细胞之间的选择蛋白-寡糖交叉相互作用,使内皮细胞可以"捕获"白细胞。其他的相互作用(存在于不同类型蛋白质之间)阻止白细胞的脱落和被冲刷。紧密接合在内皮细胞上的白细胞然后再转移到下层组织中去。

选择蛋白的调控性表达有助于靶白细胞的正确定位。虽然碳水化合物配体的特性还不是很清楚,但是寡糖结构或构象上的微妙差异可能进一步调节两类细胞之间的相互作用。或许有一天,干扰选择素-碳水化合物结合的药物能用于治疗因白细胞过度反应而引起的慢性炎症疾病。



图 8-20　黏附在人类细胞上的细菌扫描电子显微镜照片

白色圆柱状的物体是大肠杆菌细胞,它黏附在类细胞原生质膜的甘露糖残基上,这是细菌感染的第一步。

(引自 Frederic Silverblatt and Craig Kuehn, veteran Administration Hospital, Sepulveda, California)

5)许多病毒、细菌和真核生物的寄生虫,首先结合到细胞表面糖蛋白上,然后再侵入靶组织(图 8-20)。

小 结

1. 最简单的碳水化合物——单糖,被分为醛糖和酮糖。
2. 环状半缩醛型和环状半缩酮型单糖的异头碳具有 α-或 β-构型,但是构象易变。
3. 单糖衍生物包括醛糖酸、糖醛酸、糖醇、脱氧糖、氨基糖以及 α-和 β-糖苷。
4. 多糖由糖苷键相连的单糖组成。
5. 纤维素和几丁质是多糖,它们的 β(1→4)糖苷键使它们形成坚固和伸展的结构。
6. 贮存多糖——淀粉和糖原,由 α-糖苷键相连的葡萄糖残基组成。
7. 糖胺聚糖是无分支的多糖,含有糖醛酸和常被硫酸化的氨基糖。
8. 巨大的蛋白聚糖分子由透明质酸组成,带有大量的糖胺聚糖和寡糖的核心蛋白接合在透明质酸上。
9. 细菌细胞壁由肽聚糖构成,多糖和多肽链形成肽聚糖的网状结构。
10. 糖基化蛋白含有 *N*-连接的寡糖(结合在天冬酰胺上)或 *O*-连接的寡糖(结合在丝氨酸或苏氨酸上)或二者都有。同一种糖蛋白的不同分子可含有不同序列和不同定位的寡糖。
11. 寡糖在细胞表面识别现象中起重要作用。

参考文献

Abeijon, C. and Hirschberg, C.B., Topography of glycosylation reactions in the endoplasmic reticulum, *Trends Biochem. Sci.* **17,** 32–36 (1992).

Allen, H.J. and Kisailus, E.C. (Eds.), *Glycoconjugates. Composition, Structure, and Function,* Marcel Dekker (1992). [Includes chapters on nomenclature, structural analysis, lectins, and glycoproteins.]

Brady, J.W., Theoretical studies of oligosaccharide structure and conformational dynamics, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1,** 711–715 (1991).

El Khadem, H.S., *Carbohydrate Chemistry. Monosaccharides and Their Oligomers,* Academic Press (1988).

Ghuysen, J.-M. and Hakenbeck, R. (Eds.), *Bacterial Cell Wall,* Elsevier (1994). [Chapters 1 and 2 provide a good introduction to peptidoglycan structure and function.]

Hart, G.W., Glycosylation, *Curr. Opin. Cell Biol.* **4,** 1017–1023 (1992).

Kjellén, L. and Lindahl, U., Proteoglycans: Structure and interactions, *Annu. Rev. Biochem.* **60,** 443–475 (1991).

Paulson, J.C., Glycoproteins: what are the sugar chains for? *Trends Biochem. Sci.* **14,** 272–276 (1989).

Sharon, N. and Lis, H., Carbohydrates in cell recognition, *Sci. Am.* **268**(1), 82–89 (1993).

Solomons, T.W.G., *Organic Chemistry* (6th ed.), Chapter 22, Wiley (1996). [A general discussion of carbohydrate nomenclature and chemistry. Other comprehensive organic chemistry textbooks have similar material.]

Weis, W.I., and Drickamer, K., Structural basis of lectin-carbohydrate recognition, *Annu. Rev. Biochem.* **65,** 441–473 (1996).

Woods, R.J., Three-dimensional structures of oligosaccharides, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5,** 591–598 (1995).

关 键 词

单糖 monosaccharide
二糖 disaccharide
寡糖 oligosaccharide
多糖 polysaccharide
醛糖 aldose
酮糖 ketose
差向异构体 epimer
半缩醛 hemiacetal
半缩酮 hemiketal
吡喃糖 pyranose
呋喃糖 furanose
α异头体 α anomer
β异头体 β anomer
醛糖酸 aldonic acid
糖醛酸 uronic acid
糖醇 alditol

脱氧糖 deoxy sugar
氨基糖 amino sugar
糖蛋白 glycoprotein
糖脂 glycolipid
α-糖苷 α-glycoside
β-糖苷 β-glycoside
糖苷键 glycosidic bond
聚糖 glycan
同型多糖 homopolysaccharide
异型多糖 heterpolysaccharide
糖苷外切酶 exoglycosidase
糖苷内切酶 endoglycosidase
还原糖 reducing sugar
糖胺聚糖 glycosaminoglycan
微异质性 microheterogeneity
蛋白聚糖 proteoglycan
N-连接的寡糖 *N*-linked oligosaccharide
O-连接的寡糖 *O*-linked oligosaccharide
革兰氏阳性 gram - positive
革兰氏阴性 gram - negative
肽聚糖 peptidoglycan
糖基化 glycosylation
寡糖加工 oligosaccharide processing
糖型 glycoforms
复合糖 glycoconjugate
凝集素 lectin

学习思考题

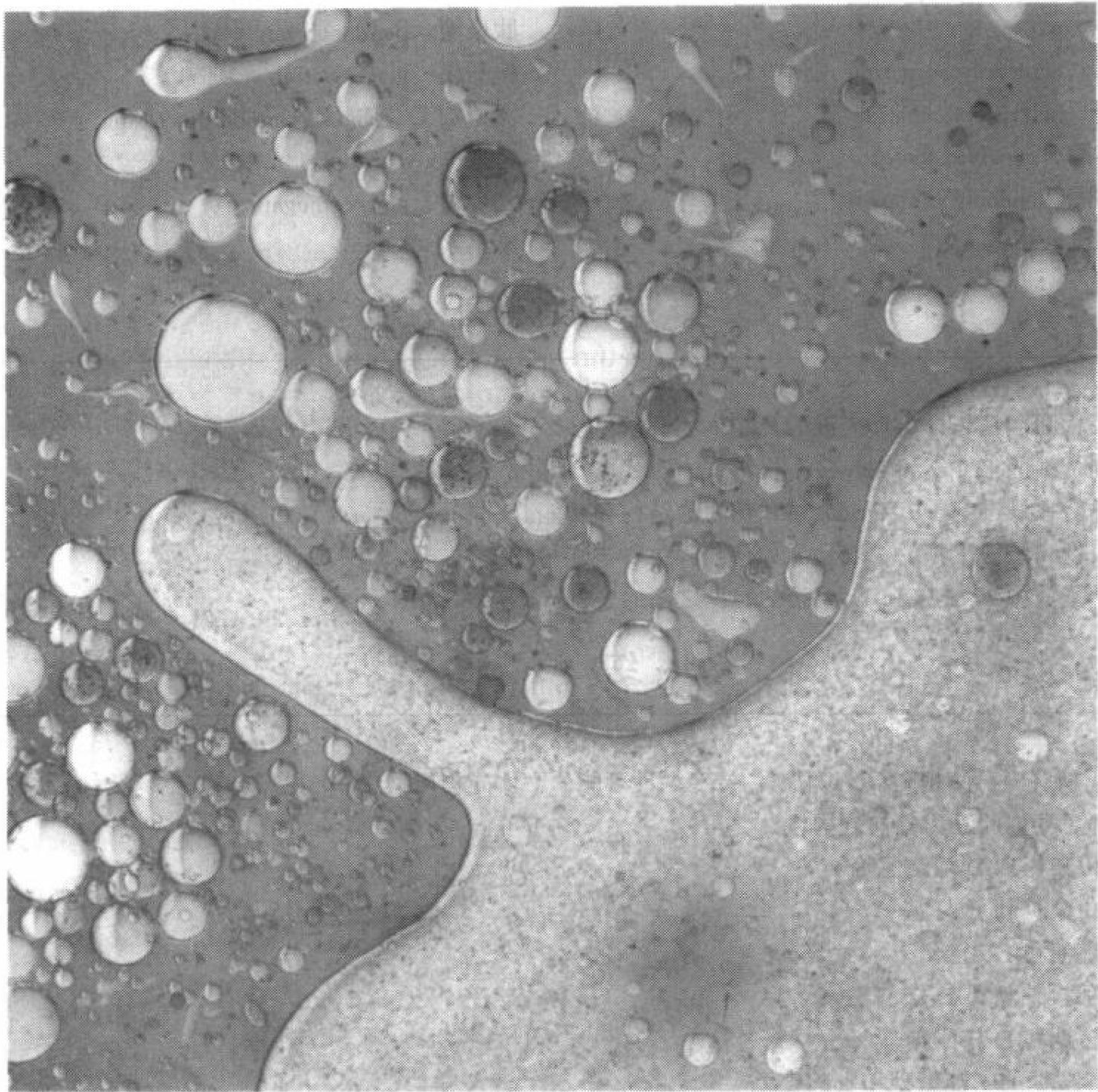
1. 指出醛糖和酮糖怎样能形成五元环和六元环。
2. 画出葡萄糖的 Fisher 和 Haworth 投影式。
3. 比较并对比纤维素、几丁质、淀粉和糖原的结构和功能。
4. 糖胺聚糖和蛋白聚糖的物理性质如何与其生物学作用相关?
5. 解释糖蛋白中 *N*-连接和 *O*-连接的寡糖之间的区别。

练 习 题

1. (a)戊酮糖、(b)己酮糖和(c)庚酮糖各有多少种可能的立体异构体?
2. 下列哪对糖彼此互为差向异构体?
   (a)D-山梨糖和 D-阿洛酮糖
   (b)D-山梨糖和 D-果糖
   (c)D-果糖和 L-果糖
   (d)D-阿拉伯糖和 D-核糖
   (e)D-核糖和 D-核酮糖
3. 画出 D-核糖的呋喃糖型和吡喃糖型。
4. (a)D-葡糖醇、(b)D-半乳糖醇和(c)D-甘油是否具有旋光活性?
5. 画出 L-墨角藻糖的 Fischer 投影式。L-墨角藻糖是哪种 L-己糖的脱氧形式?
6. 根据以下信息推导出二糖海藻糖的结构:完全水解只产生 D-葡萄糖;可被 α-葡萄糖苷酶水解,但不被 β-葡萄糖苷酶水解;不能还原 Cu^{2+} 为 Cu^{+}。
7. D-吡喃葡糖可能有多少种不同的二糖?
8. 一个含有 10 000 个残基的糖原分子每 10 个残基就有一个分支,问此分子含有多少还原端?
9. 在植物中,直链淀粉还是支链淀粉更可能是长期的贮存多糖?
10. 计算含有 100 个二糖单元的软骨素-4-硫酸的净电荷。

(南京大学 陈兰明 译)

第9章 脂 质



脂质由于它的疏水性,使它不能与水随意混合。其结构和功能也不同于其他的生物大分子。油和水的分离力在细胞结构中起着重要的决定作用。(引自 Jeremy Burgess)

---

1. 脂质的分类
   A. 脂肪酸
   B. 三酰甘油
   C. 甘油磷脂
   D. 鞘脂
   E. 类固醇
   F. 其他脂质
2. 脂双层
   A. 脂双层的形成
   B. 脂的流动性

220

脂质(希腊语:lipos, fat)是在细胞中普遍存在的第四大类分子。与核酸、蛋白质和糖不同,脂质不形成聚合物,但可形成聚集态,而且脂质正是以这种聚集态在生物膜的结构基质中起着尤为显著的作用。

与其他类型生物分子相比,脂质在结构上表现出更为繁杂的多样性,在某种程度上,可以说是包罗万象,而其共同点仅是它们大都不溶于或微溶于水。由于其疏水性,对脂质的研究要比其他易溶于水的物质(容易操作)更为困难。约从 20 世纪 80 年代中期起,脂质中很多有趣的问题已得到阐明,总的来说,其生物功能主要有三类(当然,某些脂质在细胞中明显具有不止一种功能):

1) 形成脂双层,和蛋白质一起是构成生物膜的主要成分。

2) 含有烃链的脂质是储能物质。

3) 参与细胞内和细胞间的信号转导。

本章将对一些最常见脂质的结构和物理性质,以及脂双层的性质作扼要介绍,下一章主要讨论生物膜,以及脂质一些其他的功能。

1. 脂质的分类

脂质来自于生物体,溶于有机溶剂如氯仿和甲醇中。因此可以用有机溶剂萃取分离,比分离其他生物物质更为容易。脂肪、油、某些维生素和激素,以及大多数生物膜中的非蛋白成分都属于脂质。在这部分我们将讨论几种主要类型脂质的结构和物理性质。

A. 脂肪酸

脂肪酸(fatty acid)是长烃链羧酸(图 9-1)。通常以酯化的形式存在于本章中介绍的各种类型的脂质中。表 9-1 列出了生物体内最常见的脂肪酸。在高等动植物中,残基链长为 16~18 个碳原子的脂肪酸占大多数,如**棕榈酸**(palmitic)、**油酸**(oleic)、**亚油酸**(linoleic)和**硬脂酸**(stearic acid)。碳原子小于 14 或大于 20 的脂肪酸含量很少。脂肪酸的碳原子数多为偶数,这是因为它们是由二碳单位循环途径进行生物合成的(见节 19-4)。

表 9-1　生物体中常见的脂肪酸

符号[a]	习惯命名	系统命名	结构	熔点/℃
饱和脂肪酸				
12:0	月桂酸	正十二烷酸	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$	44.2
14:0	豆蔻酸	正十四烷酸	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$	52
16:0	软脂酸	正十六烷酸	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$	63.1
18:0	硬脂酸	正十八烷酸	$CH_3(CH_2)_{16}COOH$	69.1
20:0	花生酸	正二十烷酸	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$	75.4
22:0	山萮酸	正二十二烷酸	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$	81
24:0	掬焦油酸	正二十四烷酸	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$	84.2
不饱和脂肪酸(双键均为顺式)				
16:1	棕榈油酸	9-十六碳烯酸	$CH_3(CH_2)_5CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	-0.5

续表

符号[a]	习惯命名	系统命名	结构	熔点/℃
18∶1	油酸	9-十八碳烯酸	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_7COOH$	13.2
18∶2	亚油酸	9,12-十八碳二烯酸	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_2(CH_2)_6COOH$	-9
18∶3	α-亚麻酸	9,12,15-十八碳三烯酸	$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_3(CH_2)_6COOH$	-17
20∶3	γ-亚麻酸	6,9,12-十八碳三烯酸	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_3(CH_2)_3COOH$	
20∶4	花生四烯酸	5,8,11,14-二十碳四烯酸	$CH_3(CH_2)_4(CH{=}CHCH_2)_4(CH_2)_2COOH$	-49.5
20∶5	EPA	5,8,11,14,17-二十碳五烯酸	$CH_3CH_2(CH{=}CHCH_2)_5(CH_2)_2COOH$	-54
24∶1	神经酸	15-二十四碳烯酸	$CH_3(CH_2)_7CH{=}CH(CH_2)_{13}COOH$	39

[a] 碳原子数:双键数。

引自 Dawson, R.M.C., Elliott, D.C., Elliott, W.H., and Jones, K.M., *Data for Biochemical Research* (3rd ed.), Chapter 8, Clarendon Press (1986)。

动植物中一半以上的脂肪酸残基是**不饱和的**(unsaturated)(含有双键),而且通常为**多不饱和**(polyunsaturated)(含有 2 个或更多的双键)。细菌中的脂肪酸很少有多不饱和的,通常都具有支链,或被羟化,或含有环丙烷。

如图 9-1 所示,不饱和脂肪酸第一个双键通常位于从羧基碳数第 9 和第 10 个碳原子之间,此键称为 Δ^9-双键或 9-双键。在多不饱和脂肪酸中,相邻双键通常间隔 3 个碳原子(如 —CH═

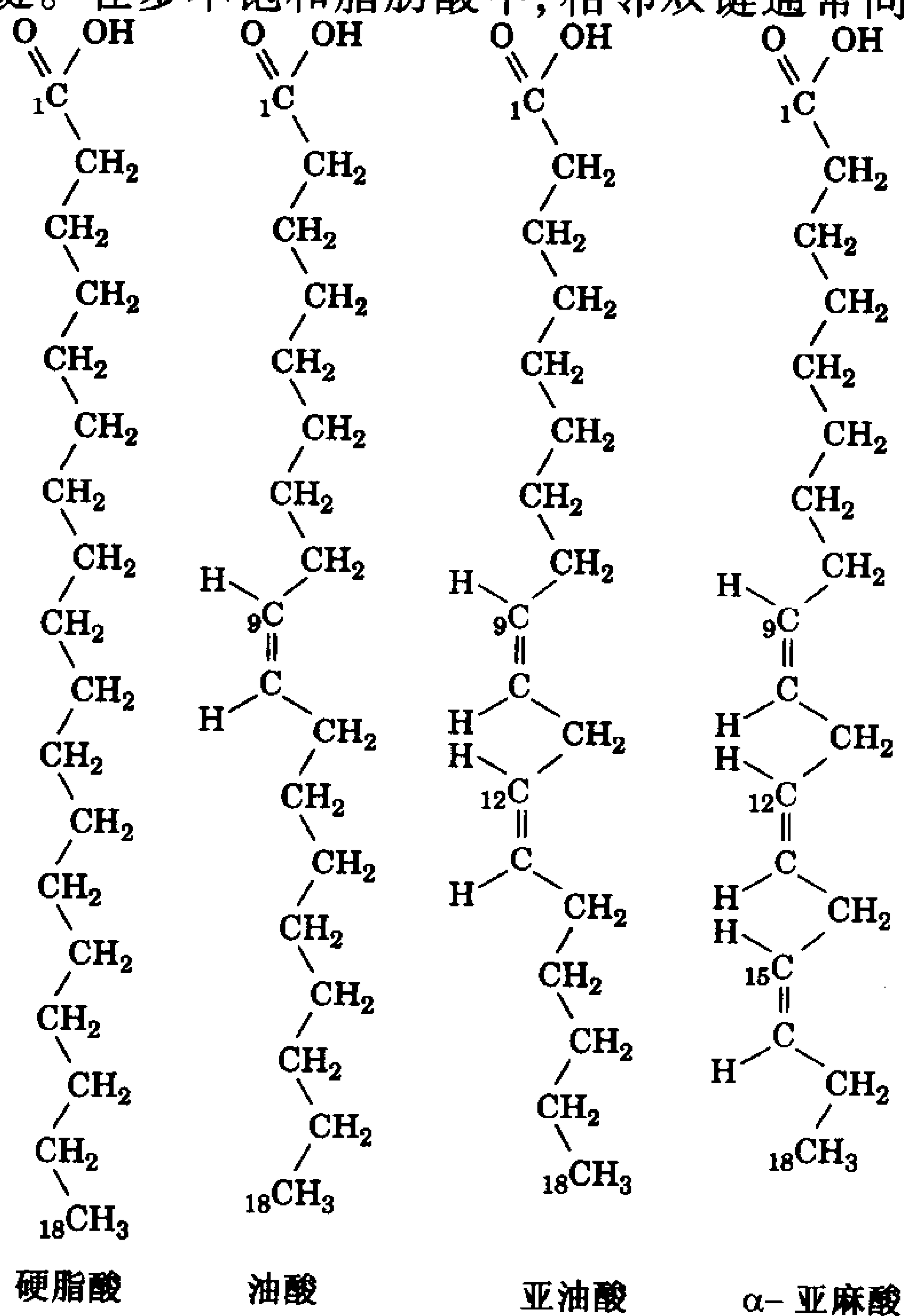


图 9-1 某些 C_{18}脂肪酸的结构式

其中双键均呈顺式构型。

CH—CH$_2$—CH═CH—)，因此不能形成共轭结构(如 —CH═CH—CH═CH—)。

饱和脂肪酸(被氢充分还原或饱和)中每个 C—C 键都可以自由旋转，柔性较高，能在较大范围内形成不同的构象。当碳链完全伸展时，相邻亚甲基之间的空间位阻最小，这种构象的能量最低。和其他大多数物质一样，饱和脂肪酸的熔点(melting point, mp)随相对分子质量的增加而增加(表 9-1)。

222

脂肪酸中的双键几乎总是采取顺式构型(图 9-1)。每个双键在碳链中增加一个刚性的 30° 弯曲，这样使得不饱和脂肪酸没有相应饱和脂肪酸紧密接触的程度高。不饱和脂肪酸范德华力的减弱导致其熔点随着不饱和度的增加而降低。我们将会看到，这种现象对生物膜有重要的意义。

B. 三酰甘油

动植物体内的脂肪和油大部分都是**三酰甘油**(triacylglycerol)，[也称**甘油三酯**(triglyceride)]的混合物，这些非极性的、不溶于水的物质是**甘油**(glycerol)的脂肪酸三酯：

$^{1}CH_2$—OH
|
^{2}CH—OH
|
$^{3}CH_2$—OH

甘油

$^{1}CH_2$—O—C(═O)—R_1
|
^{2}CH—O—C(═O)—R_2
|
$^{3}CH_2$—O—C(═O)—R_3

三酰甘油

三酰甘油是动物体内的储能物质，因此是体内含量最高的一种脂，不过它不是细胞膜的成分。

三酰甘油的种类是由它的 3 个脂肪酸残基的类型和排布不同决定的。大多数三酰甘油含有 2 个或 3 个不同类型的脂肪酸残基，可以根据它们在甘油成分上的位置命名。例如，**1-棕榈酰-2-亚油酰-3-硬脂酰甘油**。**脂肪**(fat)和**油**(oil)(不同之处在于室温下前者是固体而后者呈液态)是三酰甘油复杂的混合物，它的脂肪酸组成随生产它们的物种而异。植物油中富含不饱和脂肪酸残基，其含量比动物脂肪的高，因此其熔点也相应较低。

$^{1}CH_2$—^{2}CH—$^{3}CH_2$
O　O　O
C_1═O　C_1═O　C_1═O
CH_2　CH_2　CH_2
CH_2　CH_2　CH_2
CH_2　CH_2　CH_2
CH_2　CH_2　CH_2
CH_2　CH_2　CH_2
CH_2　CH_2　CH_2
CH_2　CH_2　CH_2
CH_2　CH_2　CH_2
CH_9　CH_9　CH_2
CH　CH_2　CH_2
CH_2　CH　CH_2
CH_2　CH_{12}　CH_2
CH_2　CH　CH_2
CH_2　CH_2　CH_2
$_{16}CH_3$　CH_2　CH_2
　CH_2　CH_2
　$_{18}CH_3$　$^{18}CH_3$

1-棕榈酰-2-亚油酰-3-硬脂酰甘油

三酰甘油的功能是作为能源

脂肪是最有效的存储代谢能量的形式，原因是脂肪比糖和蛋白质的氧化程度低，完全氧化时单位质量可以产生更多的能量。另外，脂肪是非极性物质，以无水形式存储，但糖原(见节 8-2)在生理条件下几乎结合了近自身两倍重量的水，因此，脂肪可以提供的能量大约是同样质量水合糖原代谢能量的 6 倍。

223

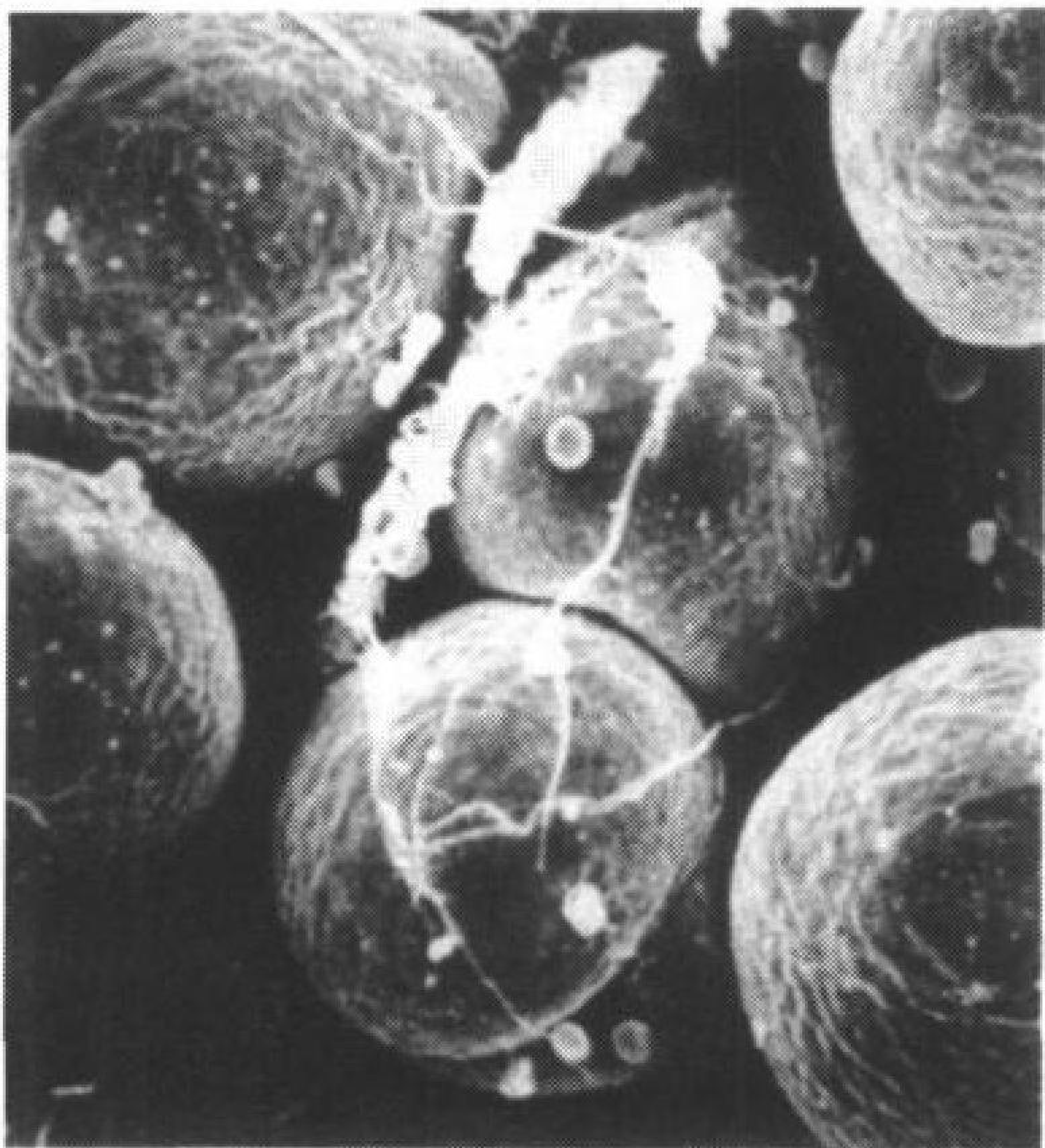


图 9-2 脂肪细胞的电镜扫描图
每个脂肪细胞含有一个脂肪小球，它几乎占据了整个细胞空间。（引自 Fred E. Hossler）

在动物体内，**脂肪细胞**（adipocyte, fatcell）（图 9-2）专门用来合成并存储三酰甘油。在其他种类的细胞中，仅有少量较小的脂肪颗粒散布在胞液中，而在脂肪细胞中，脂肪小球几乎占据了整个细胞空间。在皮下层和腹腔中有丰富的**脂肪组织**（adipose tissue）。正常人的脂肪储量（男性 21%，女性 26%）可以在饥饿状态下维持其生命长达 2～3 个月。相比之下，体内糖原用作短期的能量储备，仅能提供一天的能耗。皮下脂肪层有保温的功能，这对于经常暴露于低温下的温血水生动物，如鲸、海豹、鹅、企鹅具有极为重要的意义。

C. 甘油磷脂

甘油磷脂（glycerophospholipid）[或称**磷酸甘油酯**（phosphoglyceride）]是生物膜中主要的脂成分，是由 C1、C2 位置被脂肪酸酯化的**甘油-3-磷酸**（glycerol-3-phosphate）组成的，另外磷酸基团还与另一个基团 X 相连（图 9-3）。因此甘油磷脂是两亲性分子，脂肪酸残基构成其非极性尾部，而磷酸-X 基团构成其极性“头部”。

最简单的甘油磷脂是**磷脂酸**（phosphatidic acid），其中 X＝H，它在生物膜中的含量非常少。

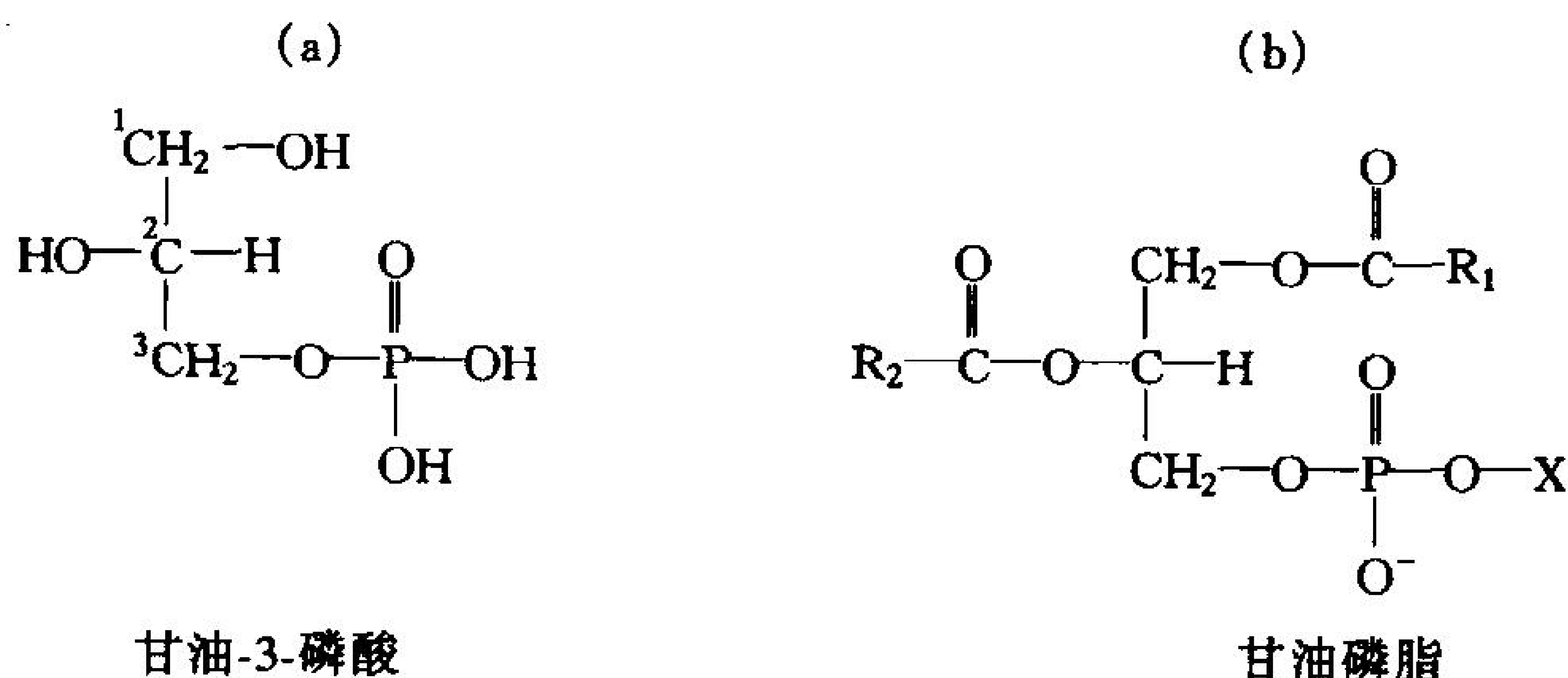


图 9-3 甘油磷酸的结构
(a)L-甘油-3-磷酸的碳骨架。(b)甘油磷脂的通式。R_1 和 R_2 是脂肪酸的长链尾部，X 来自于极性醇（见表 9-2）。

224

生物膜中常见的甘油磷脂中，极性头部的 X 基团来自于极性醇（表 9-2）。饱和 C_{16}和 C_{18}脂肪酸通常在甘油磷脂的 C1 位置成酯，而 C2 位置上通常是不饱和 C_{16}～C_{20}脂肪酸，可以根据这些脂肪酸残基的特性给单个甘油磷脂命名（如图 9-4）。含有两个软脂酸链的甘油磷脂是**肺活剂**（lung surfactant）的重要成分（见框 9-1）。

(a)

$$
\begin{array}{l}
CH_3 \\
H_3C-N^+-CH_3 \\
CH_2 \\
CH_2 \\
O \\
O-P=O \\
O \\
CH_2-\overset{H}{C}-CH_2 \\
\quad O \qquad O \\
\quad C=O \quad C=O \\
\quad (CH_2)_7 \quad (CH_2)_{16} \\
\quad C-H \qquad CH_3 \\
\quad C-H \\
\quad (CH_2)_7 \\
\quad CH_3
\end{array}
$$

(b)

图 9-4 甘油磷脂 1-硬脂酰-2-油酰-3-磷脂酰胆碱

(a) 费歇尔投影式。(b) 空间填充模型,H 白色,C 灰色,O 红色,P 绿色。注意不饱和油酸与饱和硬脂酸的区别,前者的链有弯曲。(引自 Richard Pastor, FDA, Bethesda, Maryland)

表 9-2 常见的几种甘油磷脂

$$
\begin{array}{l}
\qquad\qquad\qquad CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-R_1 \\
R_2-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-O-CH \\
\qquad\qquad\qquad CH_2-O-\overset{O}{\overset{\|}{P}}-O-X \\
\qquad\qquad\qquad\qquad\quad\;\; O^-
\end{array}
$$

X—OH 名称	—X 分子式	磷脂名称
水	$-H$	磷脂酸
乙醇胺	$-CH_2CH_2NH_3^+$	磷脂酰乙醇胺
胆碱	$-CH_2CH_2N(CH_3)_3^+$	磷脂酰胆碱(卵磷脂)
丝氨酸	$-CH_2CH(NH_3^+)COO^-$	磷脂酰丝氨酸
肌醇	H HO OH HO OH H H H H OH	磷脂酰肌醇

续表

X—OH 名称	—X 分子式	磷脂名称
甘油	$—CH_2CH(OH)CH_2OH$	磷脂酰甘油
磷脂酰甘油	$—CH_2CH(OH)CH_2—O—P(=O)(O^-)—O—CH_2—CH(—O—C(=O)—R_4)—CH_2—O—C(=O)—R_3$	二磷脂酰甘油(心磷脂)

框 9-1 健康和疾病的生物化学

肺活剂

二软脂酰磷脂酰胆碱(dipalmitoyl phosphatidylcholine, DPPC)是肺活剂中主要的脂质,肺活剂是蛋白与脂质的混合物,对于肺正常行使功能非常重要。形成肺泡(肺中的小气泡)的细胞的表面覆盖有活性剂,可以降低肺泡的表面张力。肺活性剂中含有 80%~90% 重量的磷脂,而磷脂中的 70%~80% 是磷脂酰胆碱,大部分又是二软脂酸类。

DPPC 中的软脂酸链是完全饱和的,趋于伸展而不会弯曲。这样使得 DPPC 分子可以紧密地排列,非极性尾部朝向空气,极性头部向肺泡细胞,形成一个单层。当肺部呼气时,肺泡的体积和表面积减少,紧密堆积的 DPPC 分子可以抵抗外压防止肺泡完全破裂。重新形成一个肺泡所需能量比膨胀一个已存在的肺泡要大得多。

肺活剂不断地被合成、分泌,被肺泡细胞循环利用。由于在胎儿出生之前活性剂的量较低,胎儿有患**呼吸窘迫综合征**(respiratory distress syndrome)的危险,症状是由于肺泡破裂造成的呼吸困难。通过将外源活性剂引入肺部可以治疗此病。另一种情形是成年人[**成人呼吸窘迫综合征**(adult respiratory distress syndrome)],症状通常是由于活性剂不足,其次是肺损伤,这种情况也可以用外源活性剂治疗。

磷脂酶水解甘油磷脂

甘油磷脂的化学结构——包括脂肪酰链和头部基团——可以从称为**磷脂酶**(phospholipase)的酶催化的甘油磷脂水解反应的产物来确定。例如**磷脂酶 A_2** 在 C2 位置水解下脂肪酸残基,生成**溶血磷脂**(lysophospholipid)(图 9-5)。顾名思义,溶血磷脂是一种高效活性剂,可以裂解细胞膜,导致细胞溶解。蜜蜂和蛇毒是丰富的磷脂酶 A_2 源。其他类型的磷脂酶作用于甘油磷脂的不同部位,如图 9-5 所示。

225

生物化学家对作用于脂质的酶很感兴趣,因为这种酶必须去接触包埋于非水环境下的脂。磷脂酶 A_2 作为其中一种研究较多的脂酶,属于相对较小的一种蛋白(约 14kDa, 125 个氨基酸残基)。从眼镜蛇毒中提取的磷脂酶 A_2 的 X 射线衍射结构表明,其结合甘油磷脂的方式是甘油磷脂的极性头部与酶的活性部位结合,而其疏水尾部伸出活性部位,与几个芳香族氨基酸残基侧链发生作用(图 9-6)。

在体内对三酰甘油和膜脂特异的脂酶催化它们水解,通常产物并不进行更进一步的水解,而是用做胞内、胞外的信号分子。例如,当血小板和受损细胞中的膜脂发生水解时,可产生**溶血磷**

226

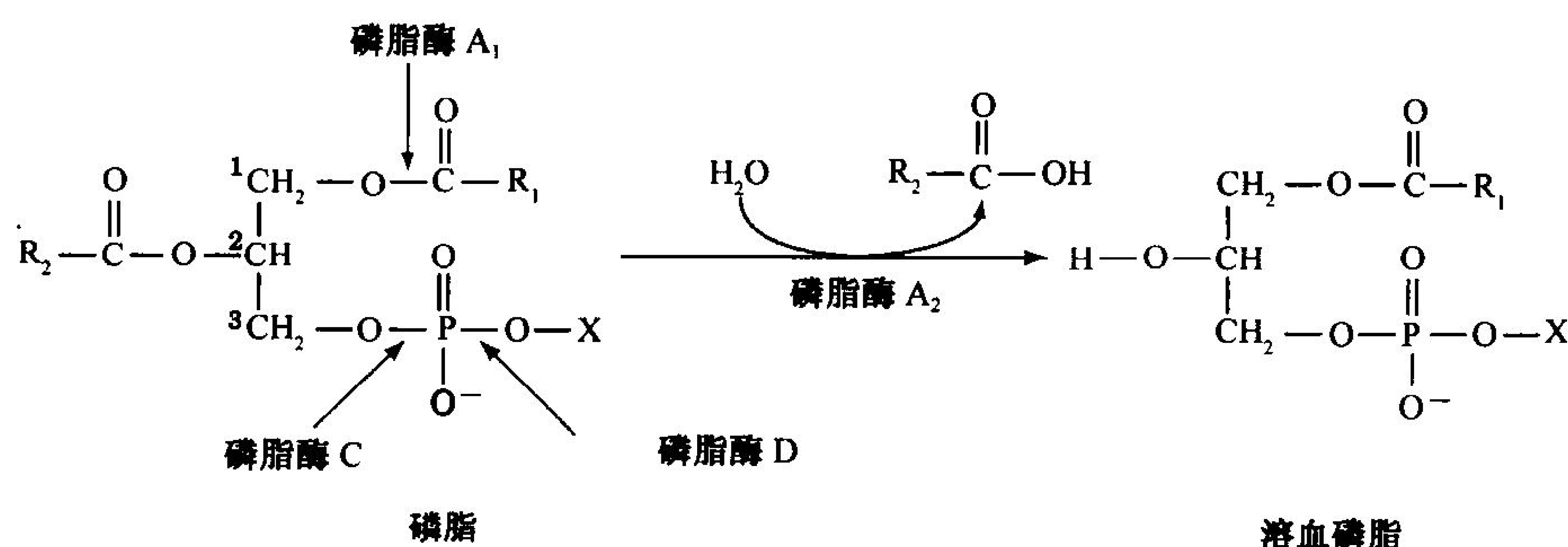


图 9-5 磷脂酶的作用
磷脂酶 A_2 水解切下三酰甘油 C2 处脂肪酸残基，生成相应的溶血磷脂。其他类型的磷脂酶根据水解部位不同名称不同，见图示。

脂酸(lysophosphatidic acid)[**1-酰基-甘油-3-磷酸**(1-acyl-glycerol-3-phosphate)]，其头部很小(未经取代的磷酸基团)，不会导致溶血，反而会刺激细胞生长，促使伤口愈合。**磷脂酶 C** 水解膜脂的产物 **1,2-二酰甘油**(1,2-diacylglycerol)是细胞间信号转导分子，可以激活一种**蛋白激酶**(proteinkinase)(见节 21-3D;激酶催化依靠 ATP 的磷酸转移反应)。

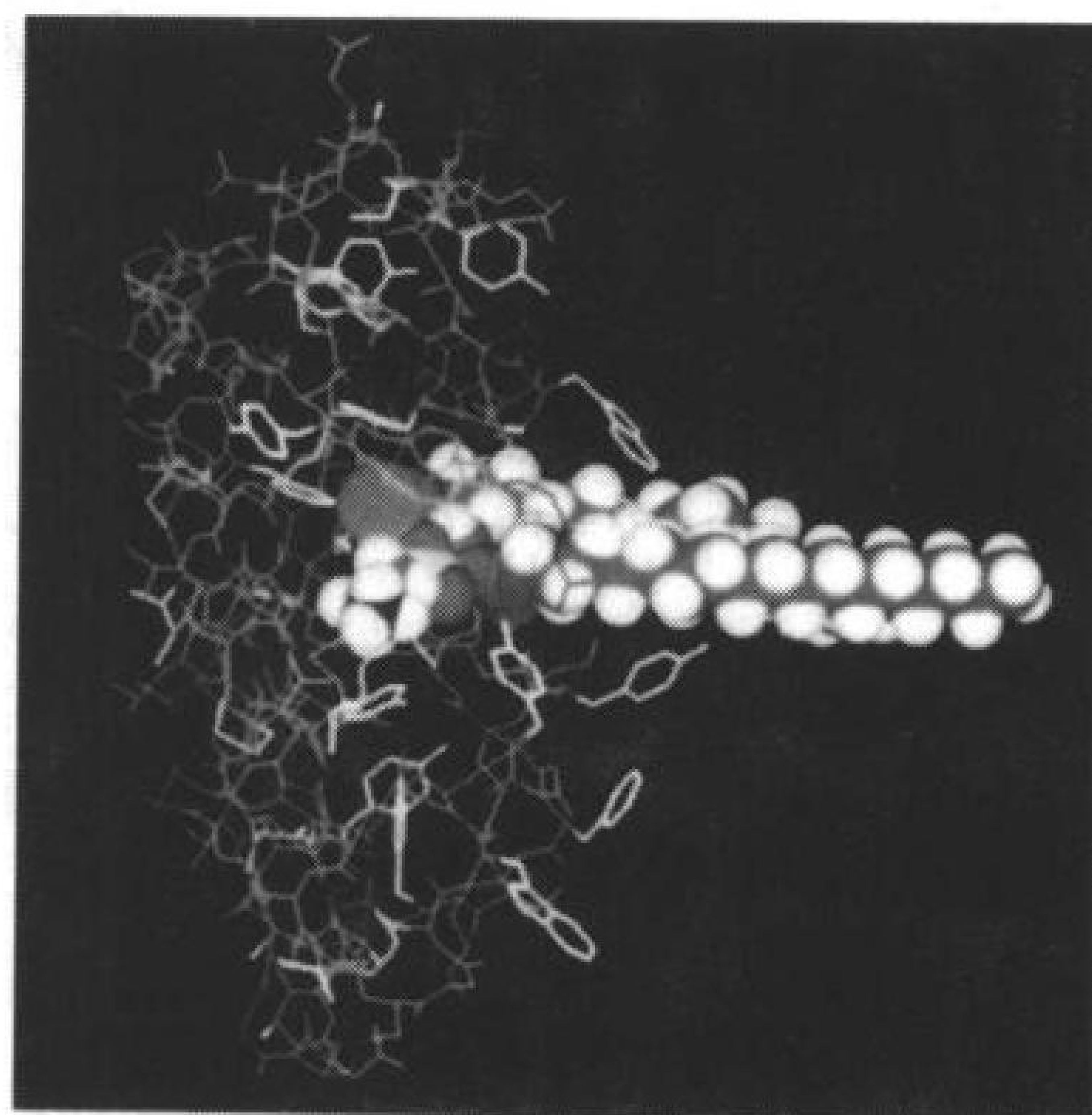
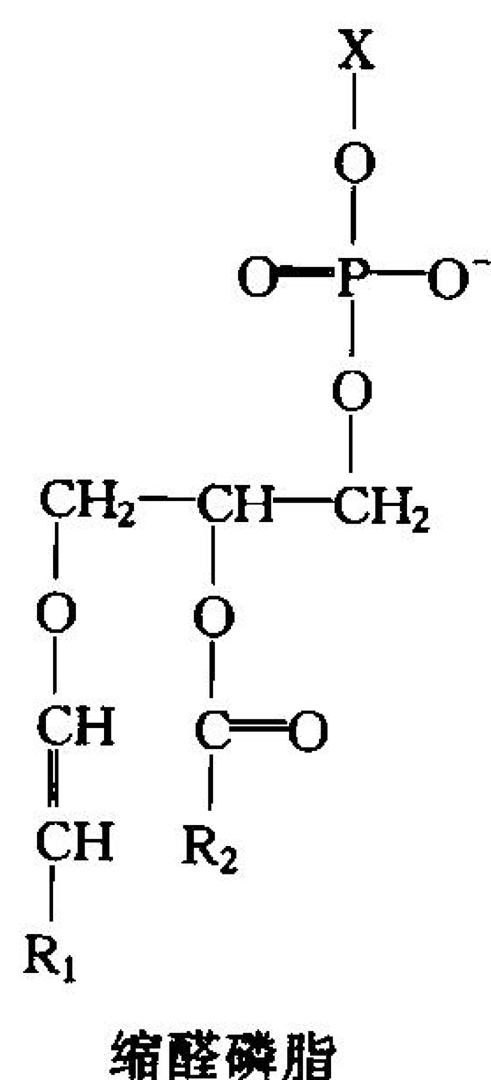


图 9-6 磷脂酶 A_2 与一个甘油磷脂的作用模型
图示为从眼镜蛇毒中提取的酶 X 射线衍射结构，空间填充模型为二豆蔻酰-磷脂酰乙醇胺，后者在活性中心的定位由 NMR 测定。活性中心处 Ca^{2+} 用紫红色表示。(引自 Edward A. Dennis, University of California tat San Diego)

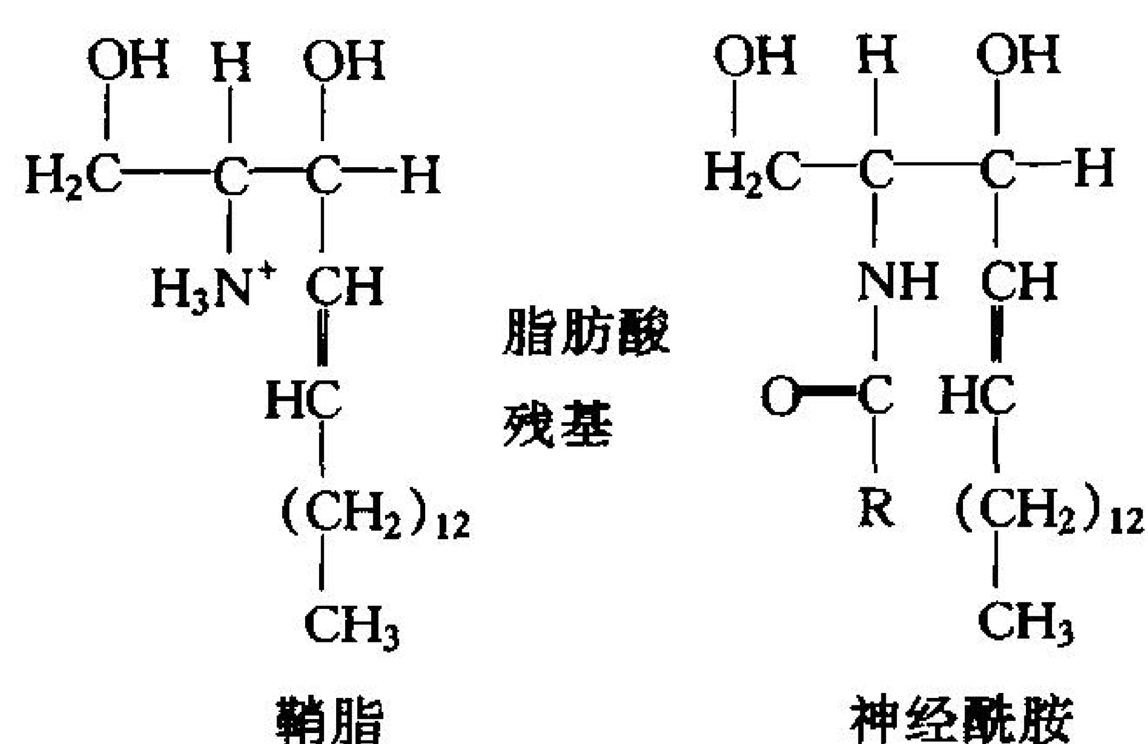
缩醛磷脂中含有一个醚键

缩醛磷脂(plasmalogen)属于甘油磷脂，其结构中 C1 取代物通过一个 α,β-顺式不饱和醚键而不是酯键与甘油相连。缩醛磷脂中最常见的头部基团是**乙醇胺**(ethanolamine)、**胆碱**(choline)和丝氨酸(表 9-2)，大多数缩醛磷脂的功能还尚待进一步研究。



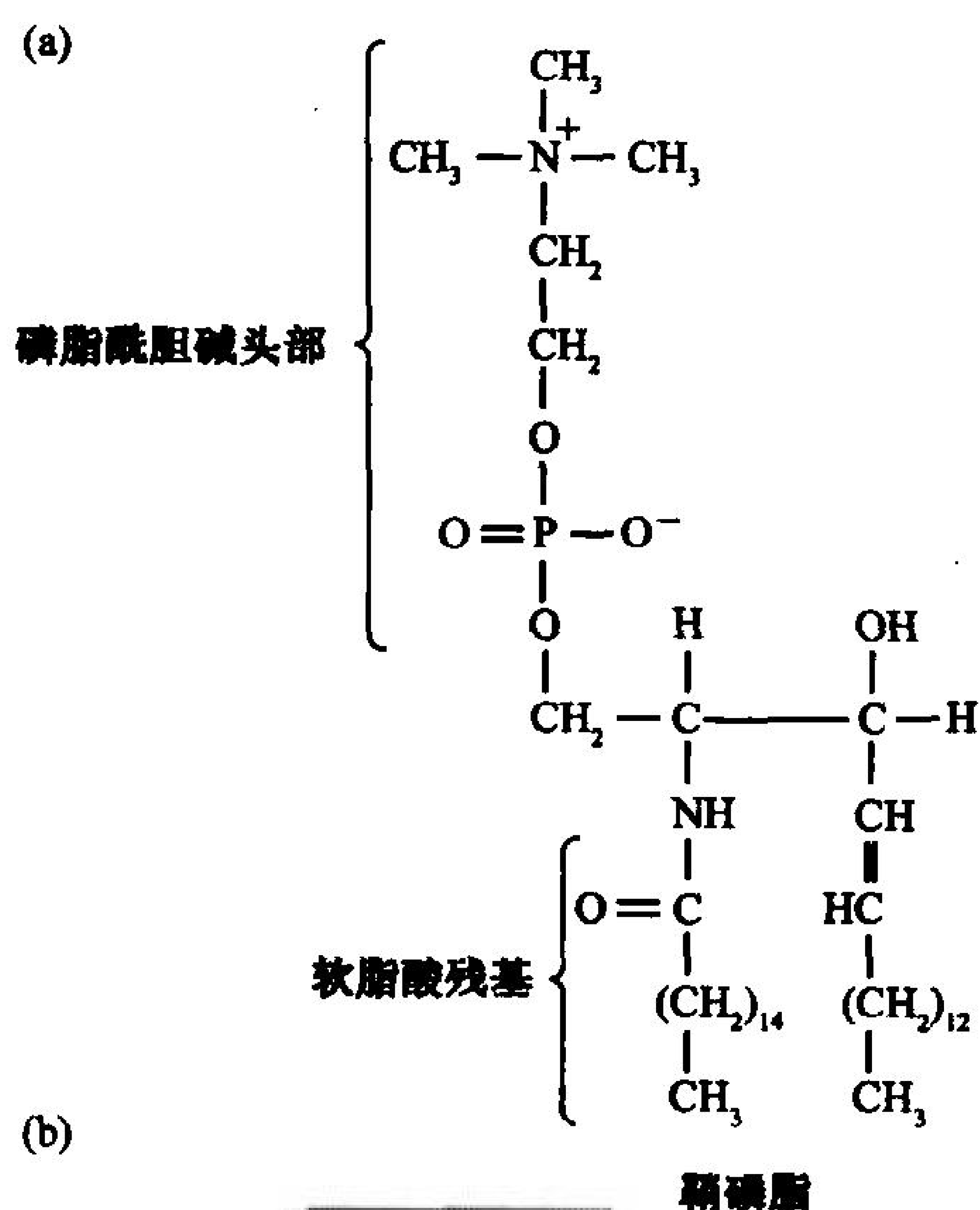
D. 鞘脂

鞘脂(sphingolipid)也是主要的膜成分。大多数鞘脂都是 C_{18} **鞘氨醇**(sphingosine)的衍生物，该醇的双键为反式构型。鞘氨醇的 N-酰基脂肪酸衍生物被称为**神经酰胺**(ceramide)。



神经酰胺是更为丰富的鞘脂的前体。

1）**鞘磷脂**(sphingomyelin)是最常见的鞘脂，由神经酰胺连接一个磷酰胆碱或磷酰乙醇胺头部基团构成，因此也可以归类为**神经鞘磷脂**(sphingophospholipid)。*尽管鞘磷脂与磷脂酰胆碱和磷脂酰乙醇胺化学组成不同，但是它们的构象和电荷分布非常相似*(比较图 9-4 和图 9-7)。鞘磷脂是包围和电隔离很多神经细胞突触的髓鞘的主要成分(图 9-8)。



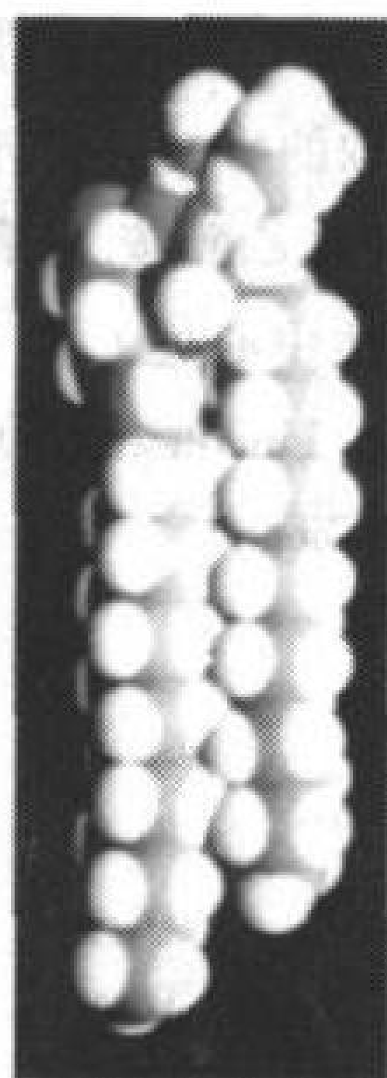


图 9-7 鞘磷脂

(a)分子式。(b)空间填充模型，H 白色，C 灰色，N 蓝色，O 红色。(引自 Richard Pastor, FDA, Bethesda, Maryland)

2）**脑苷脂**(cerebroside)由一个单糖残基连在神经酰胺的头部所构成，因此称为**糖鞘脂**(glycosphingolipid)，其中**半乳糖脑苷脂**(glycosphingolipid)和**葡萄糖脑苷脂**(glucocerebroside)最为常见。脑苷脂与磷脂不同之处在于前者没有磷酸基团，因此为非离子物质。

3）**神经节苷脂**(ganglioside)是最复杂的糖鞘脂，分子中的含有至少一个唾液酸残基的寡糖链连接在神经酰胺上。已知有 60 多种**神经节苷脂**(ganglioside)，其中 G_{M1}、G_{M2}、G_{M3} 的结构如图 9-9 所示。神经节苷脂主要位于细胞表面膜上，在大脑中所占脂的比例较高(6%)。

神经节苷脂在生理和医药上有很高的价值。其头部是复杂的碳水化合物，伸出细胞膜的表面，可以特异地接受某些垂体糖蛋白激素，而后者则参与调节很多重要的生理功能。神经节苷脂还是一些病毒蛋白毒素如**霍乱毒素**(cholera toxin)的受体。很多证据表明神经节苷脂在细胞相互识别中具有决定作用，因此它们可能在组织生长，分化，甚至癌变中也扮演着重要的角色。神经节苷脂分解紊乱是几种遗传性**鞘脂过剩病**(sphingolipid storage disease)如 **Tay-Sachs 病**的原因，症状是在幼年时无法避免神经衰退。

鞘脂和甘油磷脂一样是具有信号传达活性的更小的脂的来源。鞘磷脂本身，以及甚至更复杂的鞘脂中神经酰胺部分，似乎也可以特异地调节蛋白激酶和**蛋白磷酸酶**(protein phosphatase)(**催化去除蛋白上磷酸**

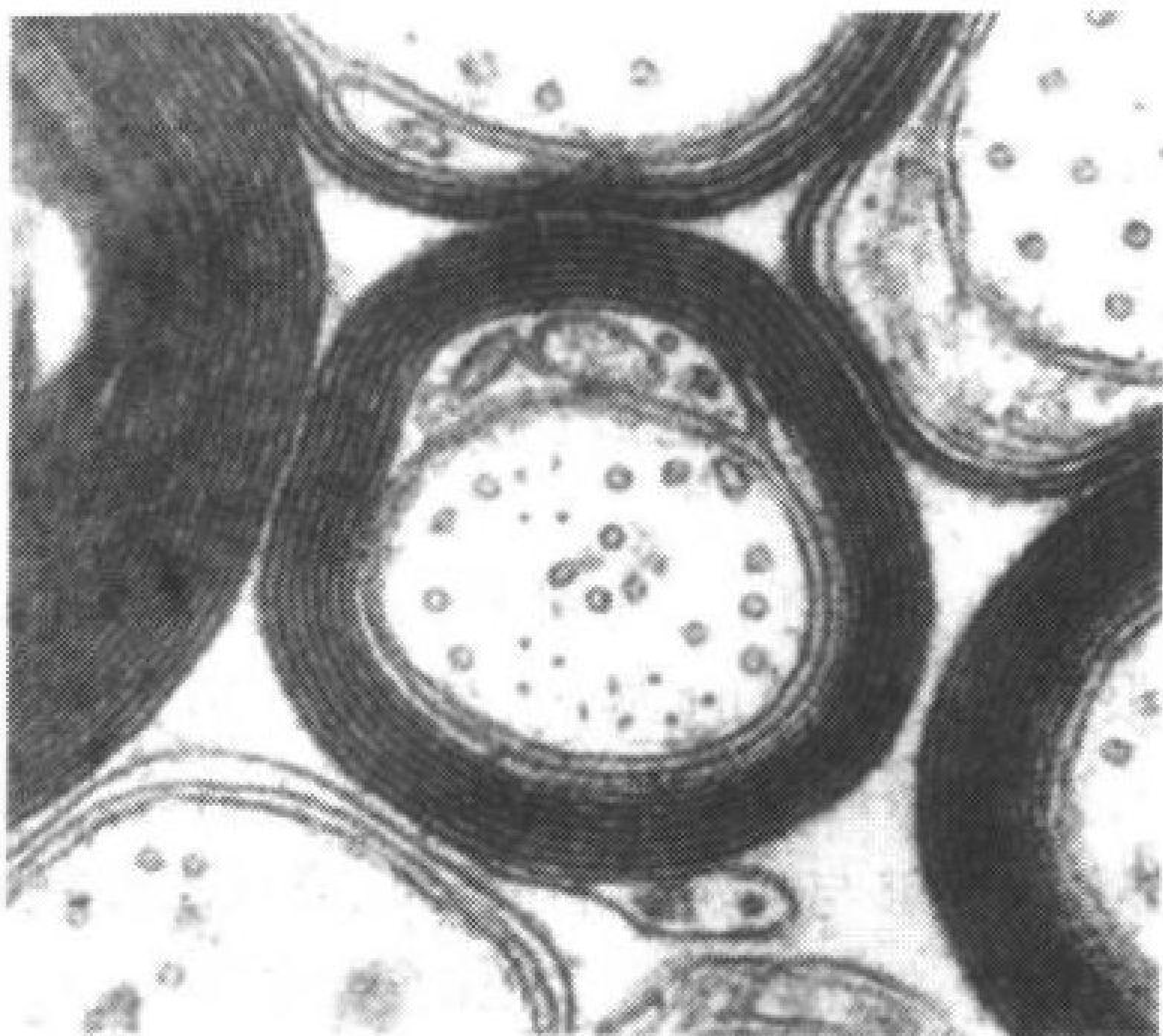


图 9-8 有髓鞘的神经纤维的电镜扫描图

如图所示是单个神经突触周围螺旋包裹的膜的横截面，髓鞘约有15～17层，脂的含量很高，起到电绝缘的作用。(引自 Cedric S. Raine, Albert Einstein College of Medicine)

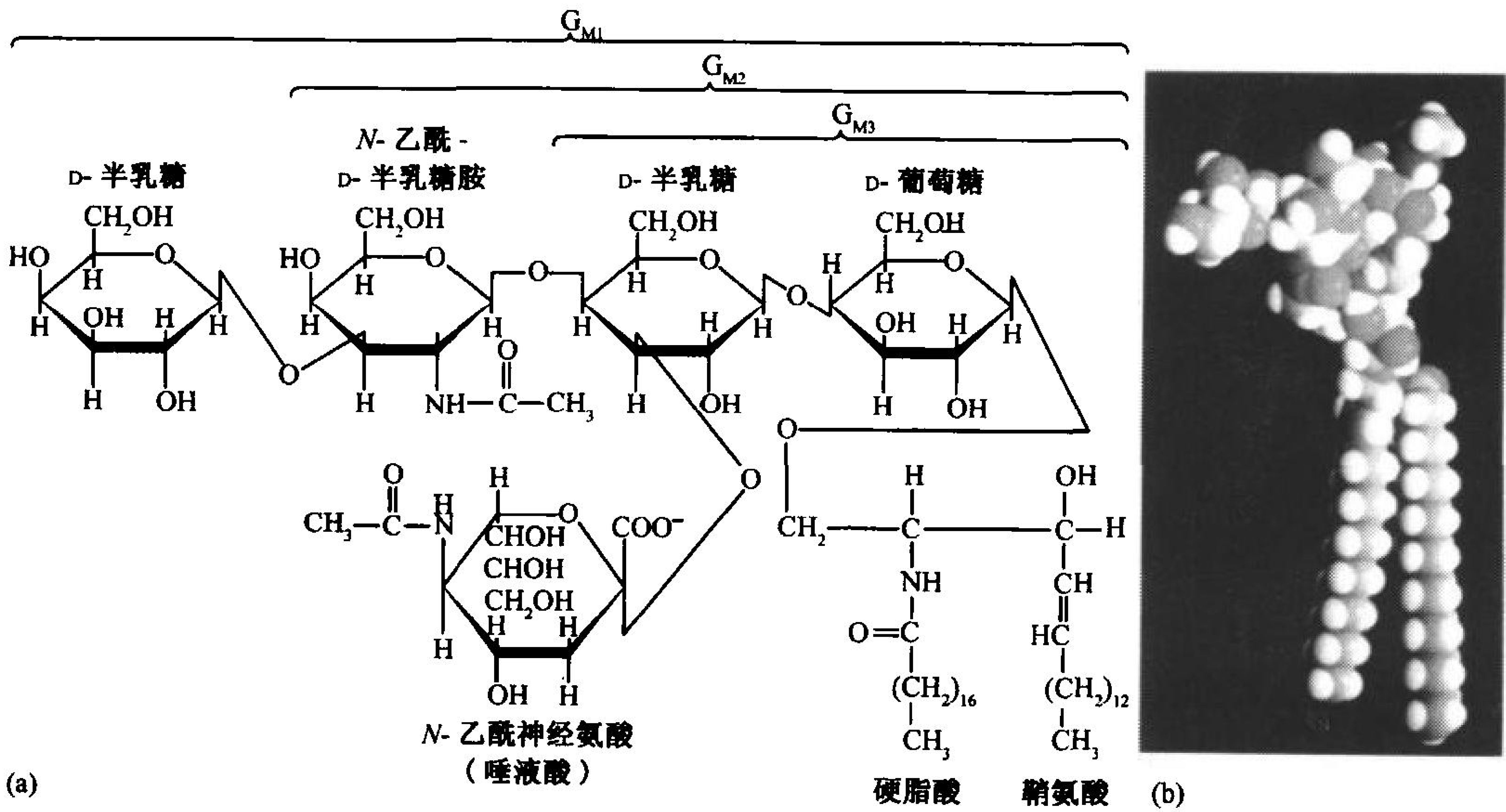


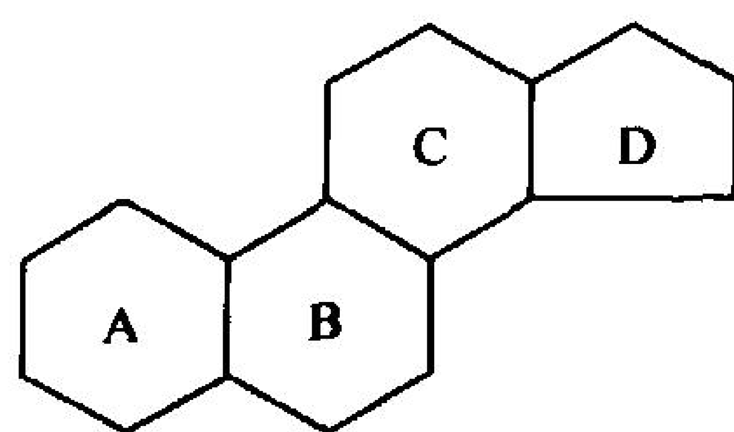
图 9-9 神经节苷脂

(a)神经节苷脂 G_{M1}、G_{M2}、G_{M3}的结构式。G_{M2}、G_{M3}与 G_{M1}的区别仅在于末端依次缺少 D-半乳糖和 *N*-乙酰基-D-半乳糖胺残基。其他的神经节苷脂在头部具有不同的寡糖基团。(b)G_{M1}的空间填充模型，H 白色，C 灰色，N 蓝色，O 红色。(引自 Richard Venable, FDA, Bethesda, Maryland)

基团的反应)的活性，细胞生长和分化受到这些酶的调控。

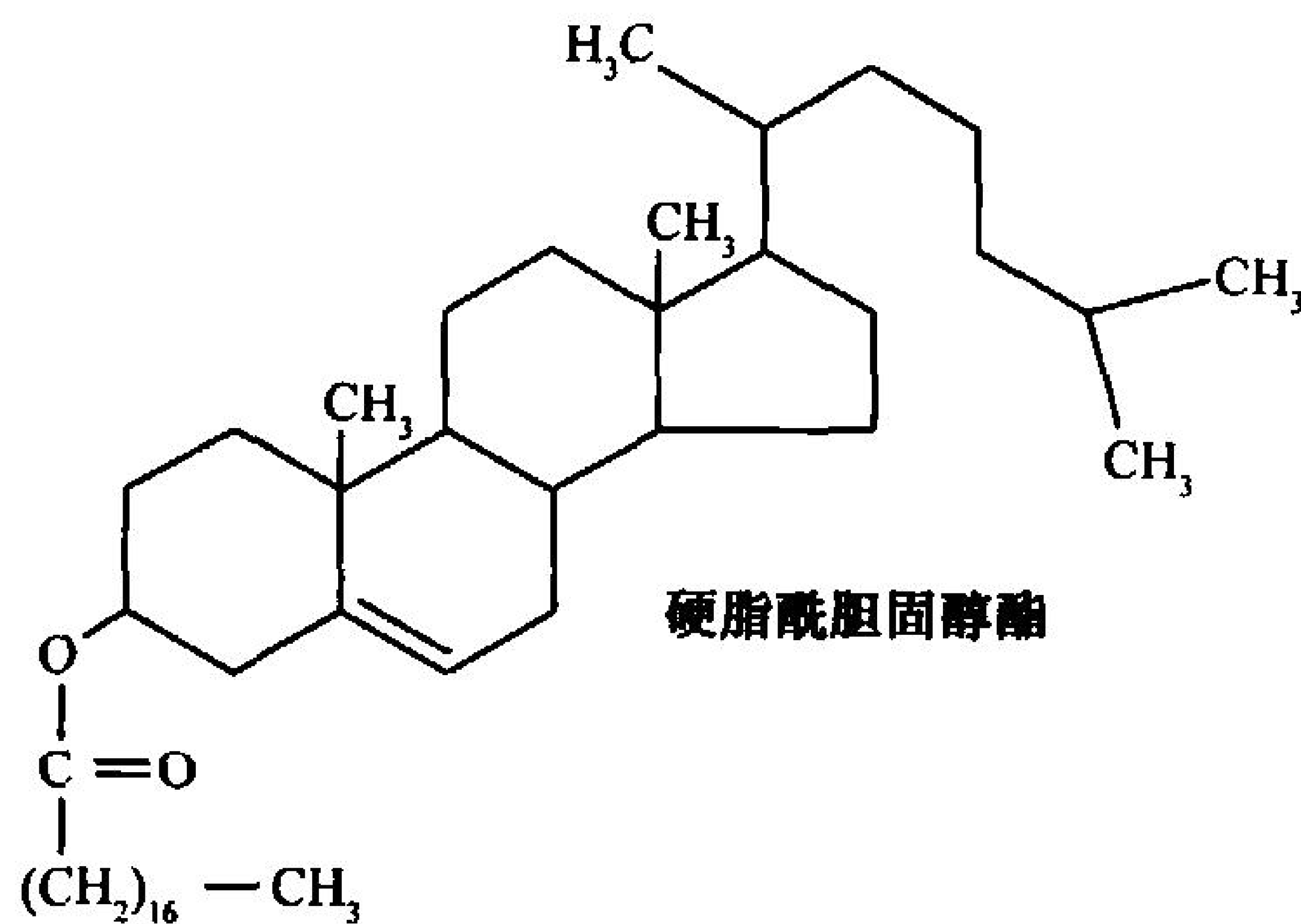
E. 类固醇

类固醇(steroid)多见于真核生物中，是**环戊烷多氢菲**(cyclopentanoperhydrophenanthrene)的

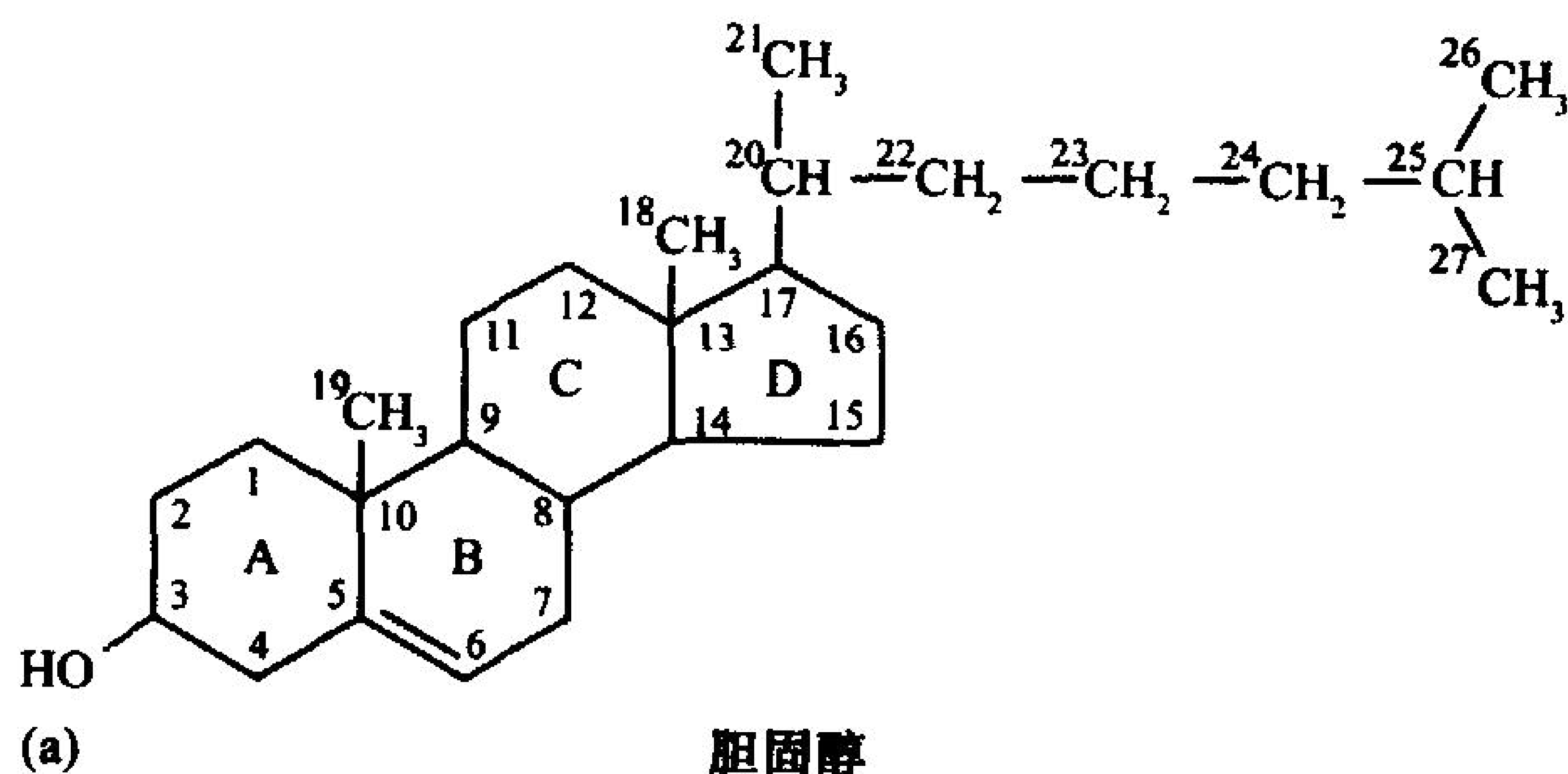


环戊烷多氢菲

衍生物，由 4 个非平面稠环组成(A～D 环)。受到不少非议的**胆固醇**(cholesterol)是动物体内含量最高的一种类固醇，可以根据 C3 上的 OH 基进一步划分为**固醇**(sterol)(图 9-10)。胆固醇是动物质膜中的主要成分之一，它的 OH 基具有微弱的两性离子的特征，而其稠环结构使其具有比其他膜脂更强的刚性。胆固醇也能够与长链脂肪酸酯化形成**胆固醇酯**(cholesterol ester)，如**硬脂酰胆固醇酯**，植物中很少有胆固醇，但可以合成其他的类固醇。酵母和真菌也合成类固醇，但其脂肪(族)的侧链和双键数目与胆固醇不同。原核生物几乎不含类固醇。



硬脂酰胆固醇酯



(a)　胆固醇　(b)

图 9-10　胆固醇

(a)标准命名系统分子式。(b)空间填充模型，H 白色，C 灰色，O 红色。(引自 Richard Pastor, FDA, Bethesda, Maryland)

229

在哺乳动物中，胆固醇是**类固醇激素**(steroid hormone)的代谢前体，后者可以调节多种生理功能，其中一些结构如图 9-11 所示。根据类固醇激素激发的生理响应可将其进行如下分类：

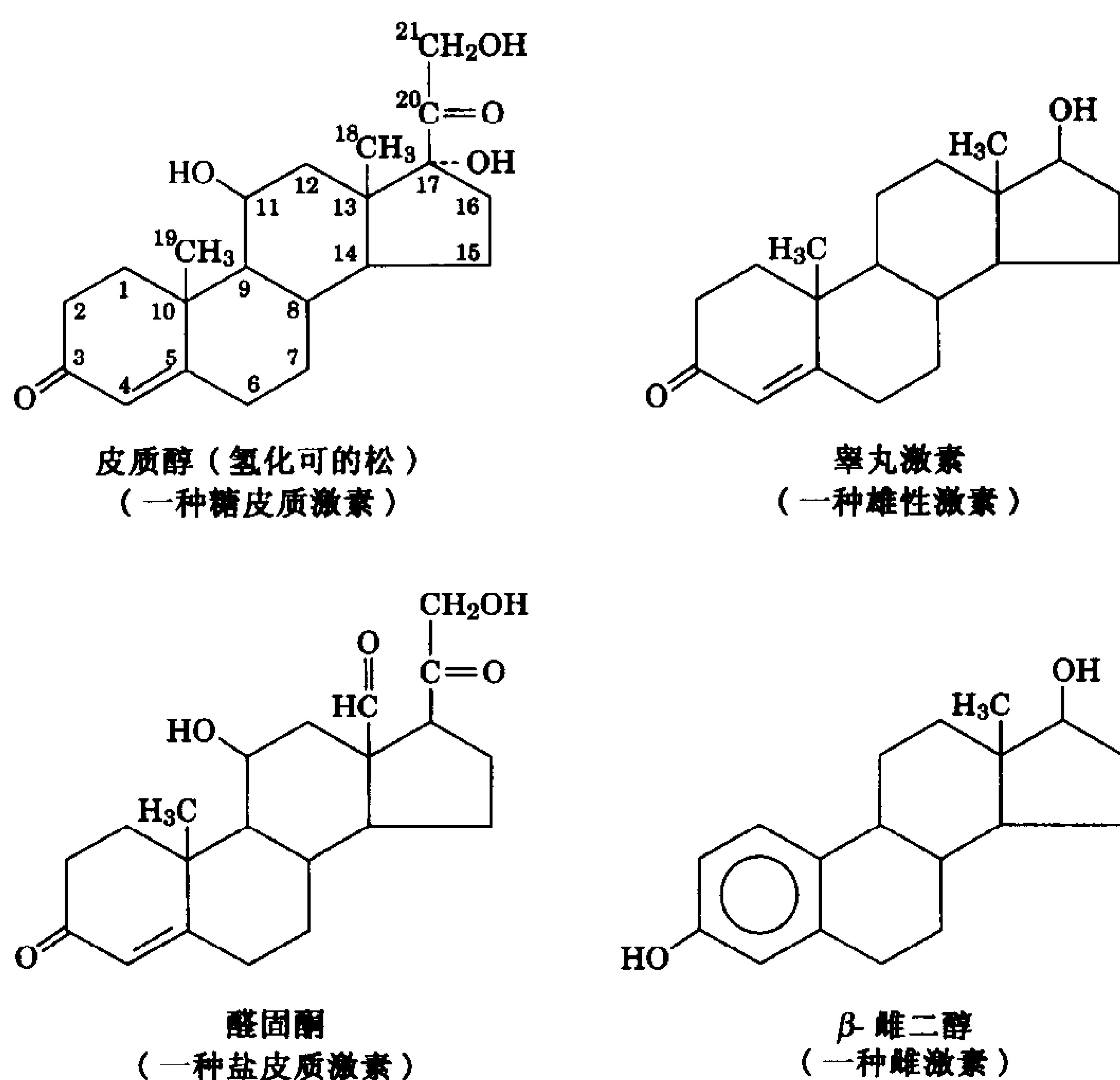


图 9-11 一些典型的类固醇激素

1) **糖(肾上腺)皮质激素**(glucocorticoid)，如**皮质醇**(cortisol)，(一种 C_{21} 化合物)，参与调节糖、蛋白质和脂的代谢，并影响很多其他的重要机能，包括炎症和应激反应。
2) **醛固酮**(aldosterone)及其他**盐皮质激素**(mineralocorticoid)调节肾脏盐、水的排泄。
3) **雄性激素**(androgen)与**雌性激素**(estrogen)影响性的发育和功能。**睾丸激素**(testosterone)(一种 C_{19} 化合物)是典型的雄性激素。

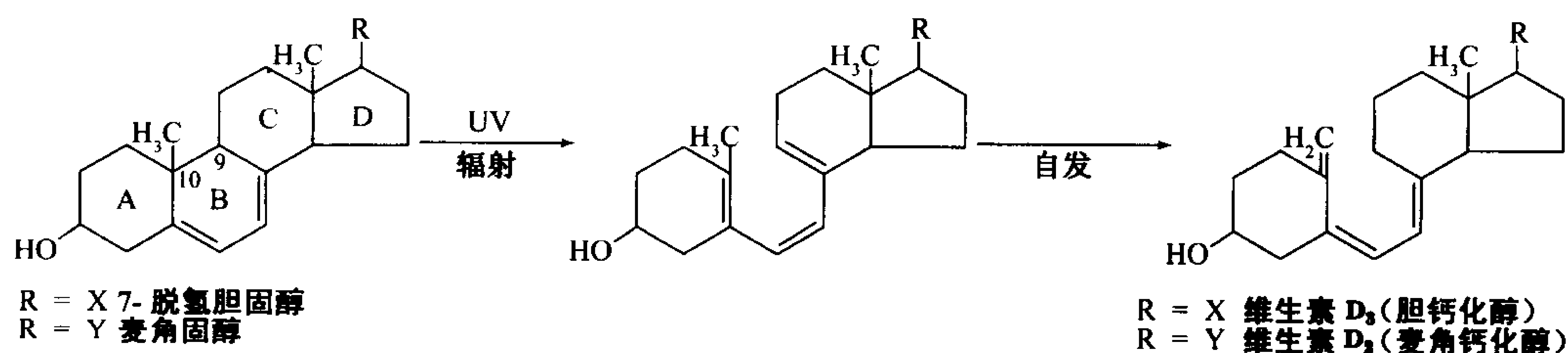
糖皮质激素和盐皮质激素由肾上腺皮质(外层)合成，雄性激素和雌性激素都由睾丸和卵巢合成(尽管前者主要存在于睾丸中，而后者主要在卵巢)，还有少量由肾上腺皮质合成。类固醇激素不溶于水，因此通过与蛋白结合由血液运送到靶组织。

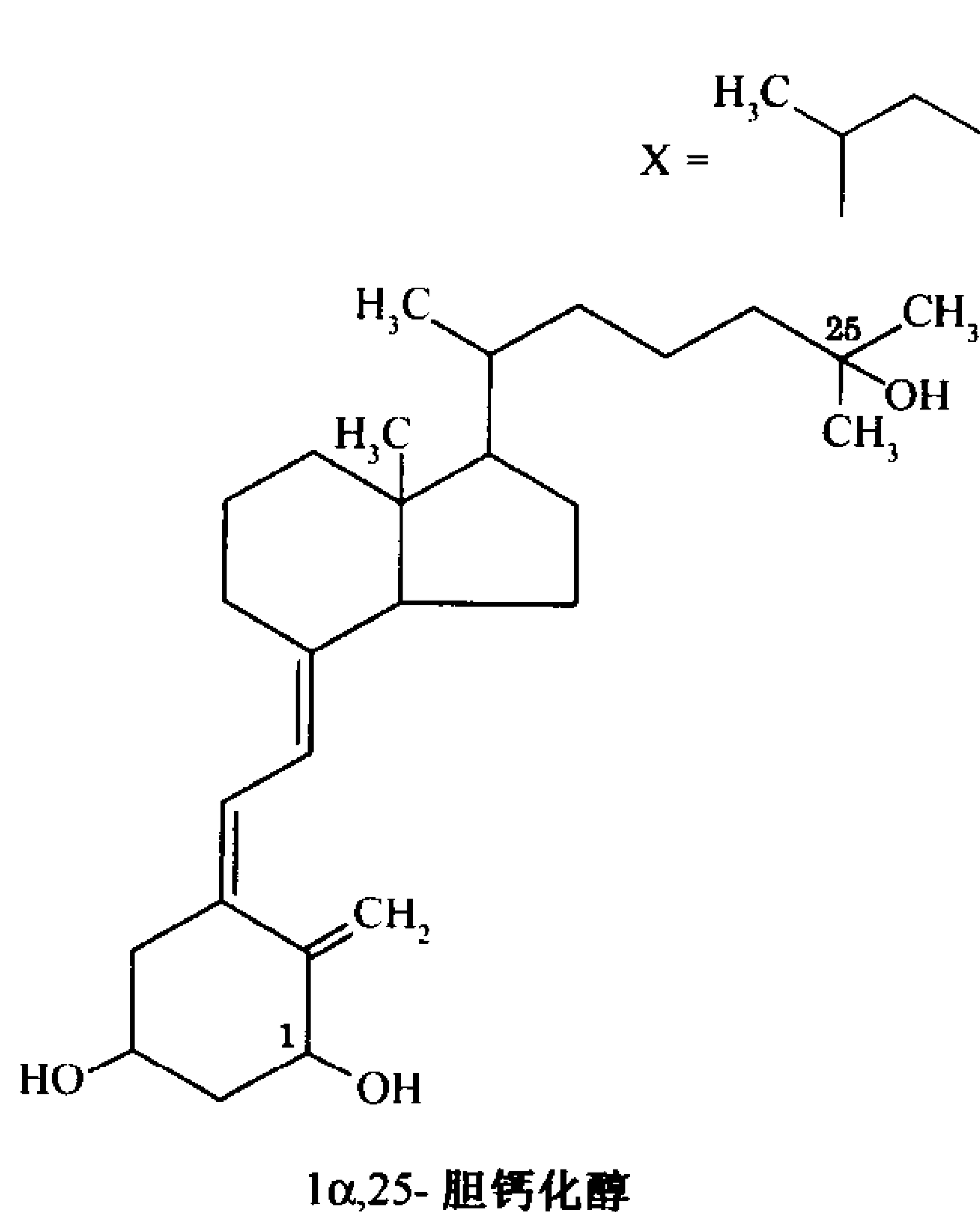
若肾上腺皮质因疾病或外伤而功能受损，将导致 Addison 病(框 7-5)，症状是血糖过高(血液中葡萄糖含量升高)，肌肉无力，Na^+ 流失，K^+ 不变，心脏功能受损，极易发生应激反应。若不用糖皮质激素和盐皮质激素治疗，病人不会感觉到非常痛苦，但会慢慢衰竭而死。 230

维生素 D 调节 Ca^{2+} 代谢

各种**维生素 D** 实际上都是激素，是类固醇中 B 环的 C9 和 C10 位之间断开形成的衍生物。**维生素 D_2**[**麦角钙化醇**(ergocalciferol)]是通过动物表皮将一种常见的奶品添加剂植物**麦角固醇**(ergosterol)进行非酶催化的紫外光解反应转变而成的，而类似的，密切相关的**维生素 D_3**[**胆钙化醇**(cholecalciferol)]来源于 **7-脱氢胆固醇**(7-dehydrocholesterol)(因此有人说维生素 D 来自阳光)。

维生素 D_2 和 D_3 都是不活泼的，通过酶促羟基化反应(加一个羟基)，在肝脏(C25 位置)和肾脏(C1 位置)可将其激活，生成 **1α,25-二羟胆钙化醇**(1α,25-dihydroxycholecalciferol)。激活型维生素 D 促进肠道吸收饮食中的 Ca^{2+} 并刺激 Ca^{2+} 从骨骼中释放来。儿童缺乏维生素 D 将导致**佝偻病**(rickets)，即骨骼钙化不足而引起的身材矮小，骨骼变形。尽管早在 1645 年就发现了软骨





1α,25-胆钙化醇

病，但一直到20世纪早期才发现动物油，尤其是鱼肝油可以防止这种缺陷型疾病，或不通过饮食，而让儿童多晒太阳或用波长230～313nm的紫外光照射也可以预防。

由于维生素D不溶于水而沉积在体内，长时间的过量摄入将导致**维生素D中毒**(vitamin Dintoxication)，结果是血液中Ca^{2+}浓度过高，软组织异常钙化，骨质疏松容易骨折，和可以导致肾衰竭的肾结石。人们注意到住得离赤道越近，人的皮肤色素水平越高，因此有人猜测皮肤色素可以阻挡过量的太阳辐射，从而防止维生素D中毒。

F. 其他脂质

除了那些研究得较充分的大量存在于细胞膜中的脂质以外，很多生物还合成其他的化合物，它们尽管不构成膜，但根据其物理性质也可以划为脂类。例如，植物蜡质包被中的脂形成一层不透水的屏障，可以防止植物细胞脱水。一些植物合成的脂可以抵御天敌和竞争者，人们用它们来做香料(见框9-2)。

框9-2 生物化学相关内容

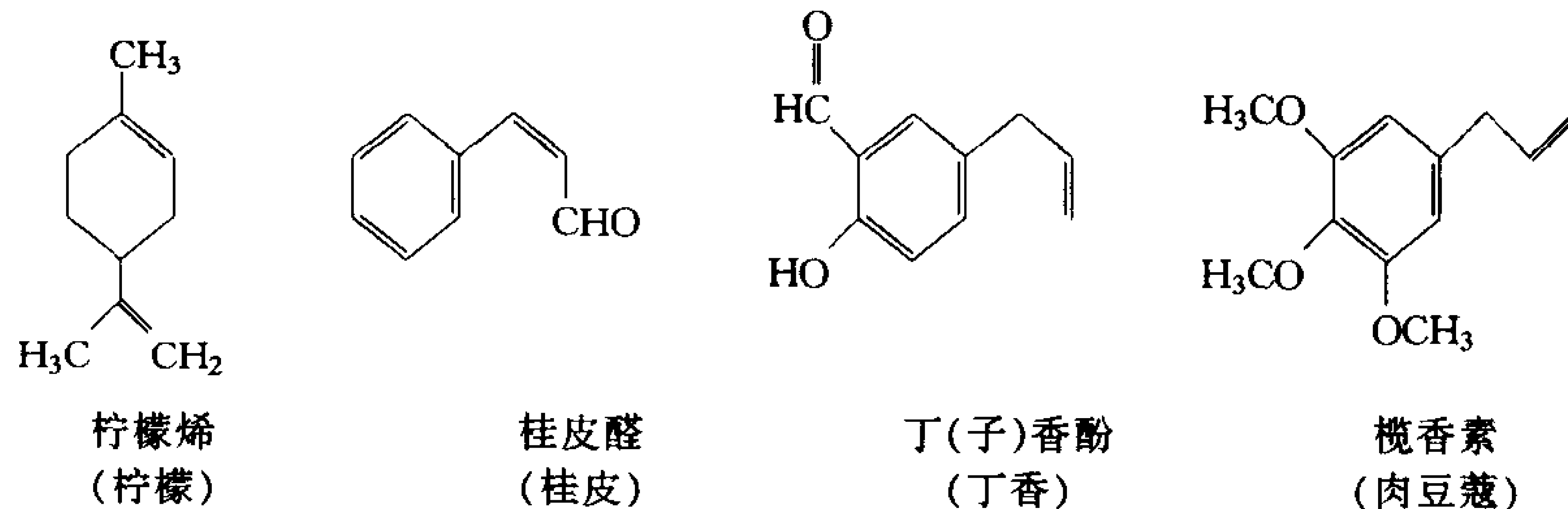
香料的生物化学

陆生动物的嗅觉器官能够分辨出成千上万种易挥发的小分子，其中大多数呈疏水性。这些物质不能直接在空气中与嗅觉器官接触，而是首先与**气味结合蛋白**(odorant binding protein)结合，然后再运送到鼻黏膜的受体部位。

很多调味剂和香料都是植物的辅助代谢物(即不是所有生物中都普遍存在的主要代谢途径的产物)，如下列化合物。一些香料，如丁香和肉豆蔻，是植物的"化学武器"，剂量高时对人有毒。当然，其他很多植物脂都具有较高的医药价值。

和其他哺乳动物一样，人食用生肉生菜也可以存活，煮烧在生化上没有任何意义。但是我们绝大情况下喜欢吃熟食(挥发性分子从中可以很容易地到达味觉器官)，这说明我们的味觉除了可以区分什么可以吃，什么有毒以外，还有其他的功能。很明显，这样有利于辨别食物哪些是腐败的，而哪些是对健康更有益的。但从香料交易的历史可以看出，很久以来人们在饮食中使用天然香料的量越来越多。

这可能是在进化过程中,人们逐渐地意识到在食物中添加香料可以使饮食变得更令人愉快,而不仅仅是维持生命的物质需要。从这个角度,烹饪技艺和饮食文化的提高有助于加强如此依赖于饮食的社会文化交流。



二十烷类是花生四烯酸的衍生物

232

其他含量较少的脂质都由相对含量较多的膜脂衍生而来。Ulf von Euler 于 19 世纪 30 年代发现了**前列腺素**(prostaglandin)(图 9-12),他认为这种物质是由前列腺分泌的。前列腺素与相关的化合物如**前列环素**(prostacyclin)、**凝血噁烷**(thromboxane)和**白三烯**(leukotriene)都是 C_{20}化合物,故合称为**二十烷**(eicosanoid)类。二十烷起作用时浓度很低,它们可以产生疼痛,发热,参与调节血压,血液的凝聚和再生。与激素不同,二十烷类不是通过血液运送到靶组织的,而是直接在合

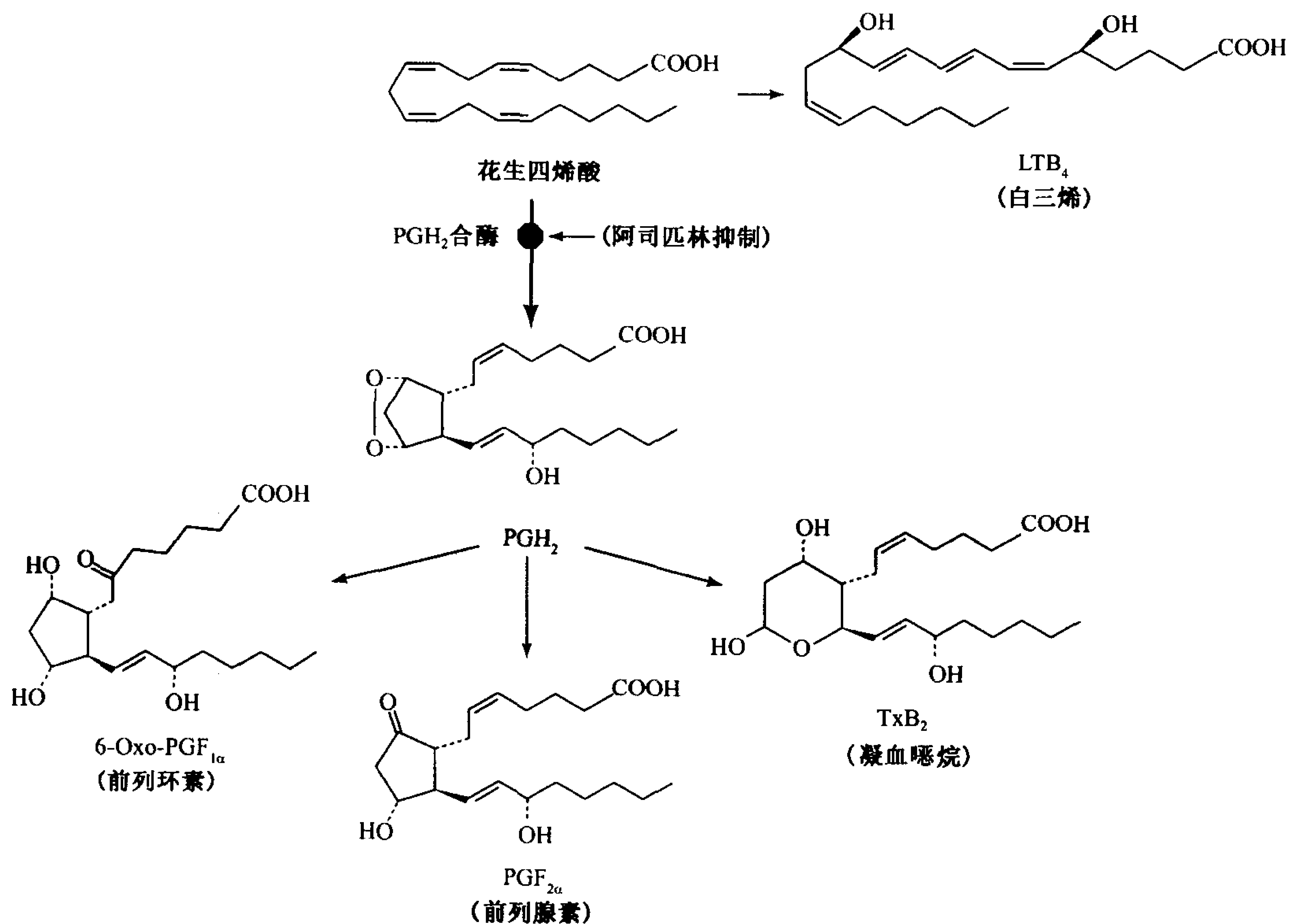


图 9-12　二十烷类

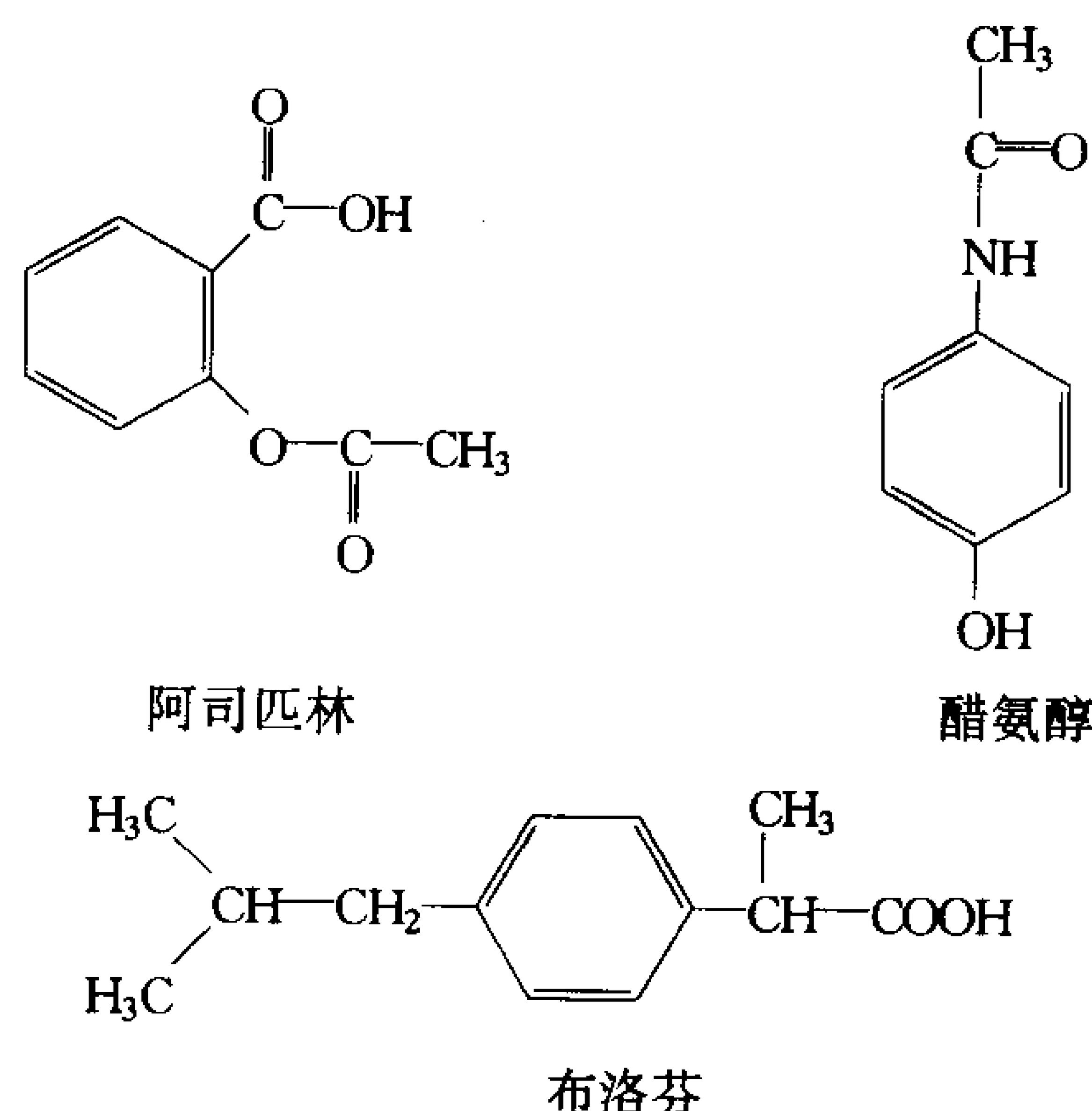
花生四烯酸酯是前列腺素(PG)、前列环素和凝血噁烷(Tx)的合成前体,它也可以生成白三烯。尽管每种二十烷类只给出一个例子,但每种都可以有很多生理上非常重要的衍生物,可以用字母下标表示(如 PGH_2 表示前列腺素 H_2)。

成它们的细胞附近起作用。实际上,多数二十烷类在几秒钟或几分钟之内就降解了,这样限制它们不能在更远的组织起作用。自然而然,催化合成各种二十烷类的酶受到了药物研究的密切关注。

花生四烯酸(aradchidonic acid)是人体内最重要的二十烷类前体,它是有 4 个双键的多不饱和脂肪酸,在细胞膜中以**磷脂酰肌醇**(phosphatidylinositol)的 C2 酯和其他磷酸脂的形式存在,其脂肪酸残基可以通过磷脂酶 A_2 的作用释放出来。

每种花生四烯酸酯代谢产物都与具体的组织有关。例如,血小板几乎只产生凝血噁烷,而内皮细胞(位于血管壁上)主要合成环前列腺素。有意思的是,凝血噁烷刺激血管收缩和血小板聚集,而前列环素却起相反的作用,这样可以保持一种心血管系统的平衡。

阿司匹林(aspirin)作为一种止痛药、退热剂和消炎药,自 19 世纪以来就有着广泛的应用,而其作用机理直到 1971 年才由 John Vane 阐明:阿司匹林将 **PGH_2 合酶**(PGH_2 synthase)的一特定丝氨酸残基酰基化,阻止花生四烯酸靠近其活性中心,由此可以抑制由花生四烯酸合成前列腺素、前列环素和凝血噁烷的反应。**非甾体消炎药**(nonsteroidal anti-inflammatory drug, NSAID)如**布洛芬**(ibuprofen)和**醋氨醇**(acetaminophen)与此酶非共价结合也可以类似地"堵住"其活性中心。



阿司匹林　　醋氨醇

布洛芬

白三烯可以在多种细胞内通过一条对阿司匹林不敏感的途径由花生四烯酸合成(图 9-12)。很多炎症和过敏紊乱(如哮喘)都和白三烯水平升高有关。

2. 脂双层

生命系统中脂分子很少以自由的形式存在,而是和其他的分子共存,通常是其他脂类。在这一部分,我们将讨论脂如何聚集并形成微团和脂双层,后者是生物膜结构的基础,因此也是我们主要的研究对象。

A. 脂双层的形成

在水溶液中,两亲性分子如肥皂和去污剂可以形成微团(烃链伸出水面,头部聚集;见节 2-1C)。这种分子的排列形式消除了两亲分子中疏水端与水的不利接触,而使其极性头部可以溶于水中。

可以从几何上近似预测一个微团的大小和形状。单尾的两亲性分子,如肥皂阴离子呈锥形(亲水头部比尾端大)(图 9-13 a, b),可以形成类似球体或椭球体的形状,每个微团所含分子的数量与具体的两亲性分子有关,但数量级大都在几百个分子左右。分子数目太少,微团的疏水核心容易暴露

于水中；而分子数目太多，则微团核心空洞太大，能量不稳定（图 9-13c）。当然，大微团变平可以使中空变小，但结果是曲率减小，还是可以产生中空（图 9-13d）。

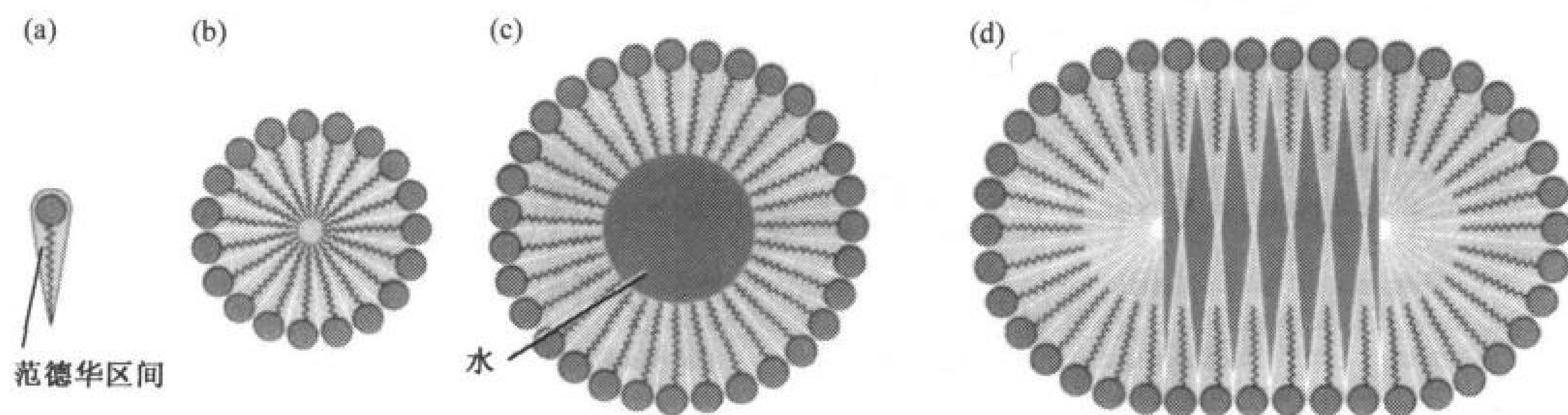


图 9-13　单尾脂的聚集

脂质的锥形范德华区间（a）使其可以有效地排列成类球状微团（b）。微团的直径取决于尾部的长度。类球状微团含有的脂分子比理想情况下多时（c），会产生一个不利于结构的充满水的中心（蓝色）。这种微团会变平使中空变小，但当这种椭球形微团伸长时，也会产生一个充满水的中心（d）。

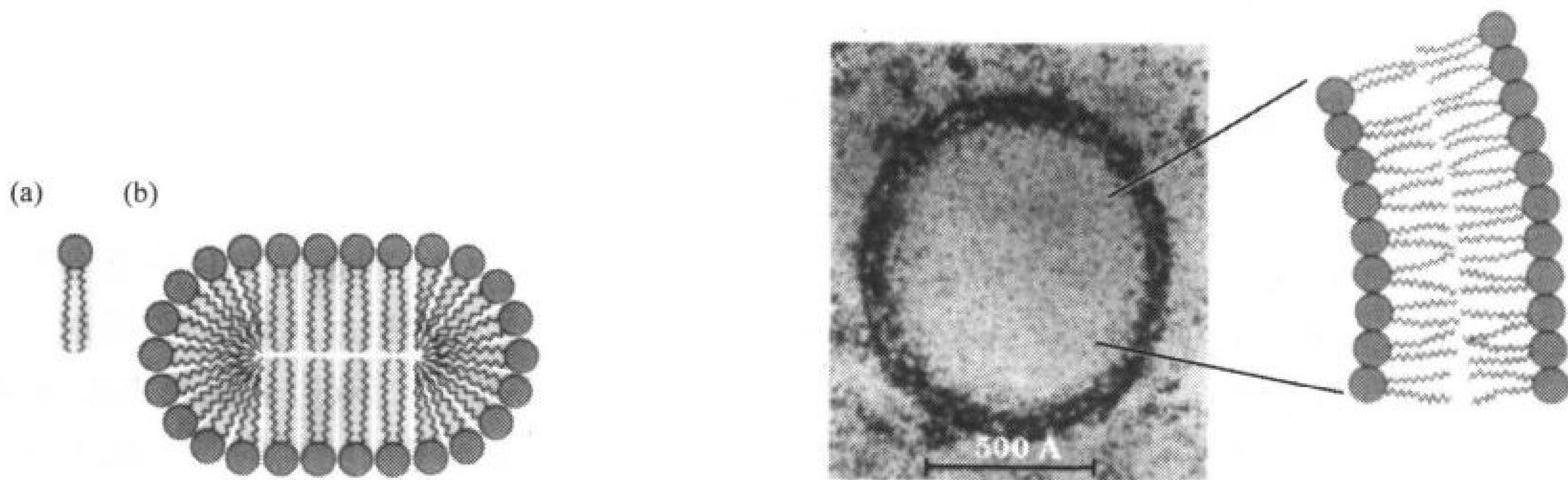


图 9-14　磷脂形成脂双层

脂的柱形范德华区间（a）使其可以形成延展的圆盘状微团（b），其作为脂双层描述得更为具体。

图 9-15　电镜下的脂质体

如图所示，脂质体的壁由一个脂双层构成。（引自 Walther Stoeckenius, University of California at San Francisco）

甘油磷脂和鞘脂有两条链"尾巴"，形成微团的截面接近一个矩形（图 9-14a）。这种分子在空间上要求形成圆盘式微团（图 9-14b），可以看成是生物膜的延伸结构。电镜和 X 射线衍射结果表明这种**脂双层**（lipid bilayer）厚度约 60Å，这个值与伸展的烃链尾部的长度相近。

磷脂（甘油磷脂或鞘脂）的悬浮液可以形成**脂质体**（liposome）——中间充满溶剂的、仅有单一脂双层包被的封闭结构（图 9-15），通常直径有几百 Å，在特定条件下，可以形成特别均一的尺寸。脂质体形成后相当稳定，可以用透析、凝胶过滤或离心的方法纯化，因此可以制备得到内部环境与溶液不同的脂质体。脂质体可以用作生物膜研究的模型，而且它们可以通过质膜融合被很多细胞吸收，因此有望成为药物的载体。

B. 脂的流动性

脂分子在脂双层间的转移称为**横向扩散**（transverse diffusion）或**翻转**（flip-flop）（图 9-16a），这种情况极其少见。这是因为此过程发生需要让脂的水合极性头部通过双层的疏水内部环境，

其半衰期需几天甚至更长。与横向扩散相反，脂在双层平面内的流动性很强[**侧向扩散**(lateral diffusion)，图 9-16b]，在一个细菌细胞内，一个磷脂分子在 1s 内可以扩散大约 1μm 长的距离，因此可以将脂双层看成一个二维流体。

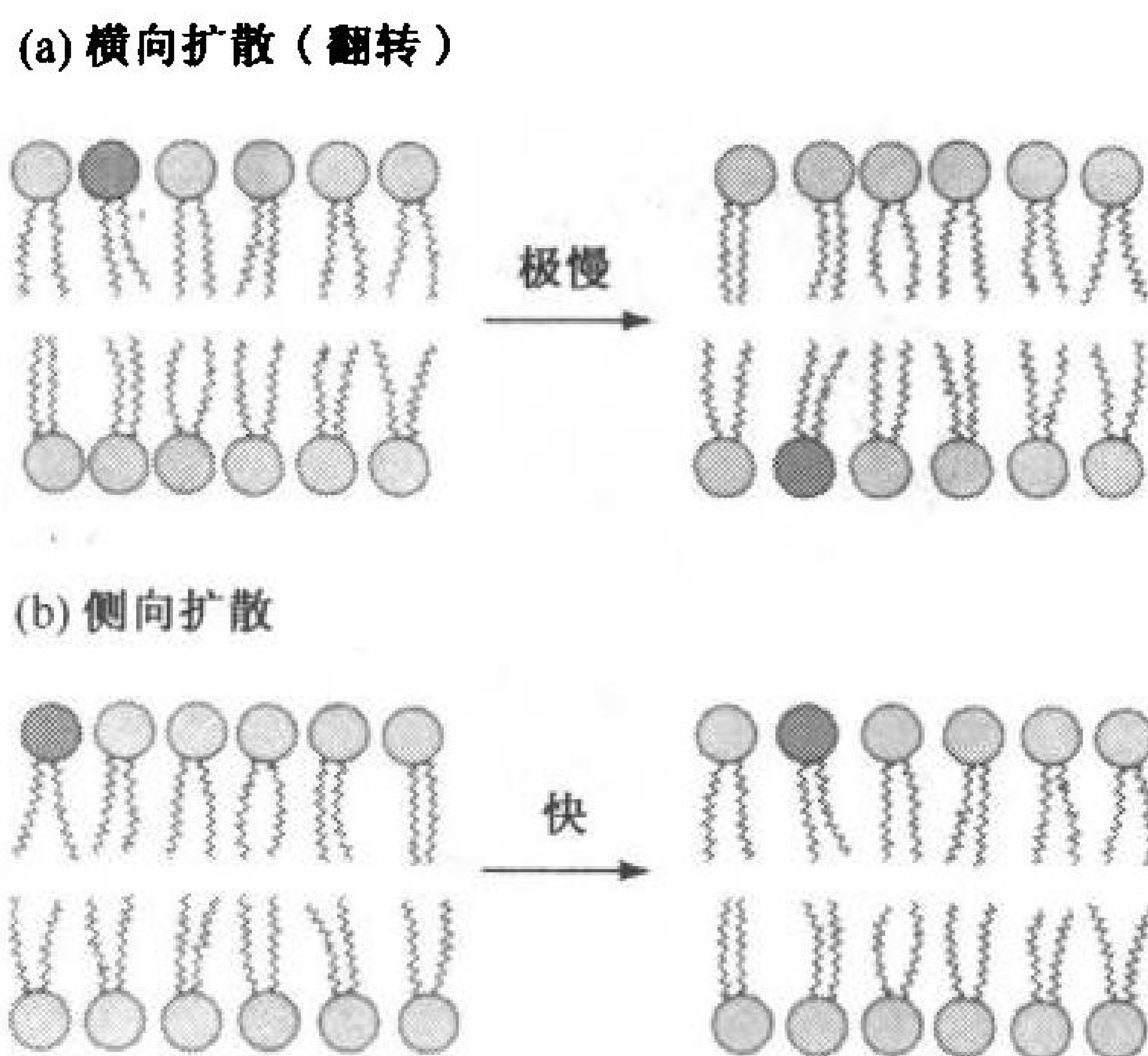


图 9-16 脂双层中的磷脂扩散

(a)横向扩散(翻转)，即磷脂分子从某一层扩散到另一层。(b)侧向扩散，是双层中每一层相邻的脂分子相互交换位置。

脂分子尾部 C—C 键旋转使脂双层内部处于恒定的运动之中，测量其各种物理参数表明双层内的黏度与轻矿物油相近，在分子动力学模拟中，通过计算原子受力，可以得到随时间变化的原子位置，其结果也证实了这一点(图 9-17)。靠近脂的头部基团时，双层的黏度大幅度增加，因为头部的旋转受到限制，并且其横向移动也受到邻近极性或带电基团的制约。当然，脂双层的外

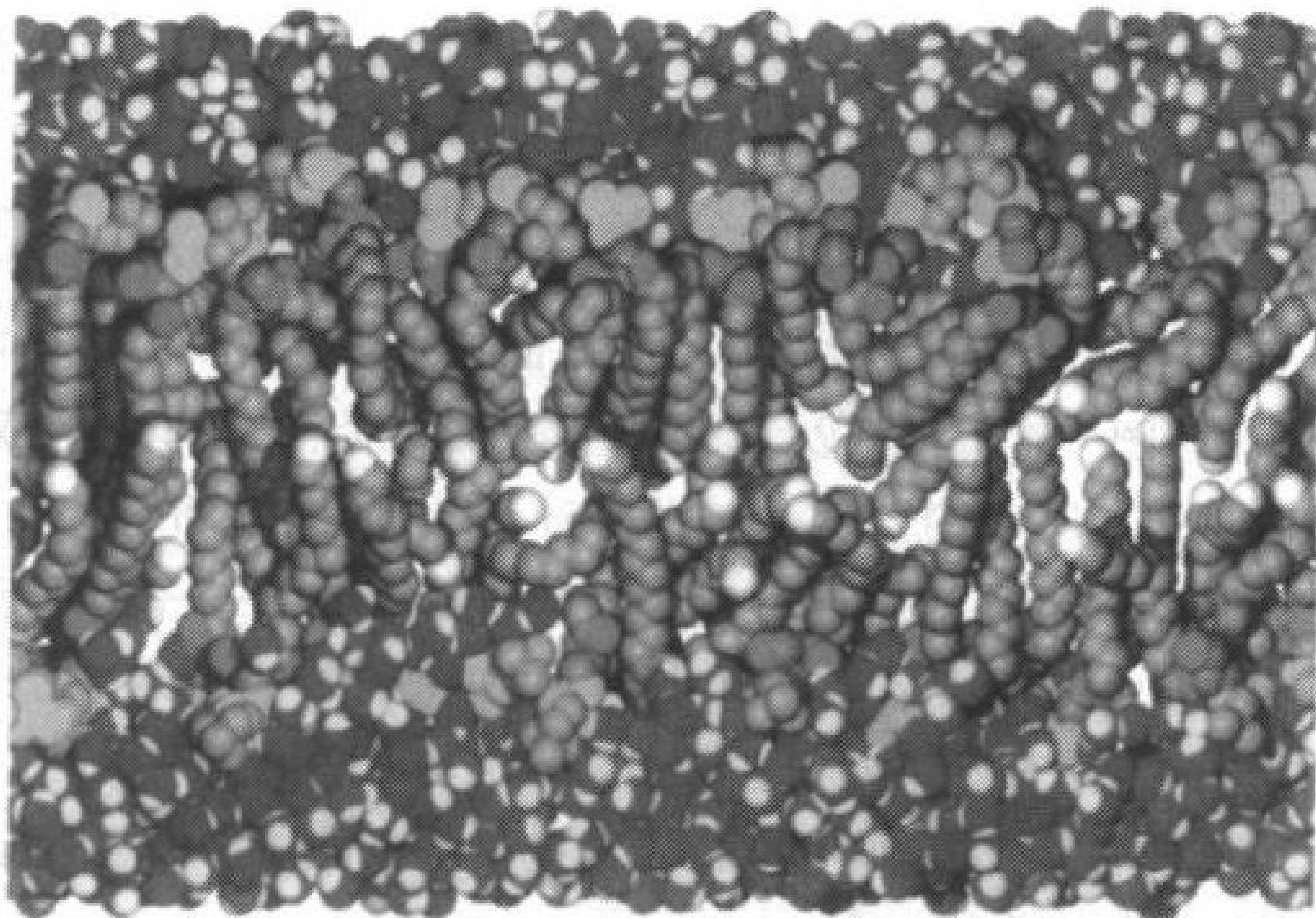


图 9-17 脂双层模型某时刻的图像

计算机模拟处于水相的脂双层中二棕榈酰卵磷脂的分子构象，其中烃链 C：灰色(末端甲基 C：黄色；甘油 C：褐色)；酯基 O：红色；磷酰基 P 和 O：绿色；胆碱 C 和 N：浅紫色；水分子中的 O：深蓝色；H：浅蓝色。脂中的氢略去。(引自 Richard Pastor and Richard Venable, FDA, Bethesda, Maryland)

表面浮动着几层有序排列的水分子。

注意如图9-17中所示，脂的疏水末端并不像图9-16中那样僵直地排列，而是弯曲并交叉地排列着，这并不奇怪。典型的生物膜中含有很多不同的脂分子，其尾部的长度不同或者由于存在双键而相互交扭在一起，在生理条件下，高度流动的链会在双层内部“见缝插针”。

236

脂双层的流动性受温度影响

当某脂双层冷却到一特定**相变温度**(transition temperature)以下时，会发生一系列的相变化，变成凝胶状的固体，即失去了流动性(图9-18)。高于相变温度时，高度流动的脂只按照某些方向排列，处于一种称之为**液晶**(liquid crystal)的状态。温度降低时，烃链变得更为僵直，因此脂双层在凝胶状态的厚度比在液晶状态时的大。

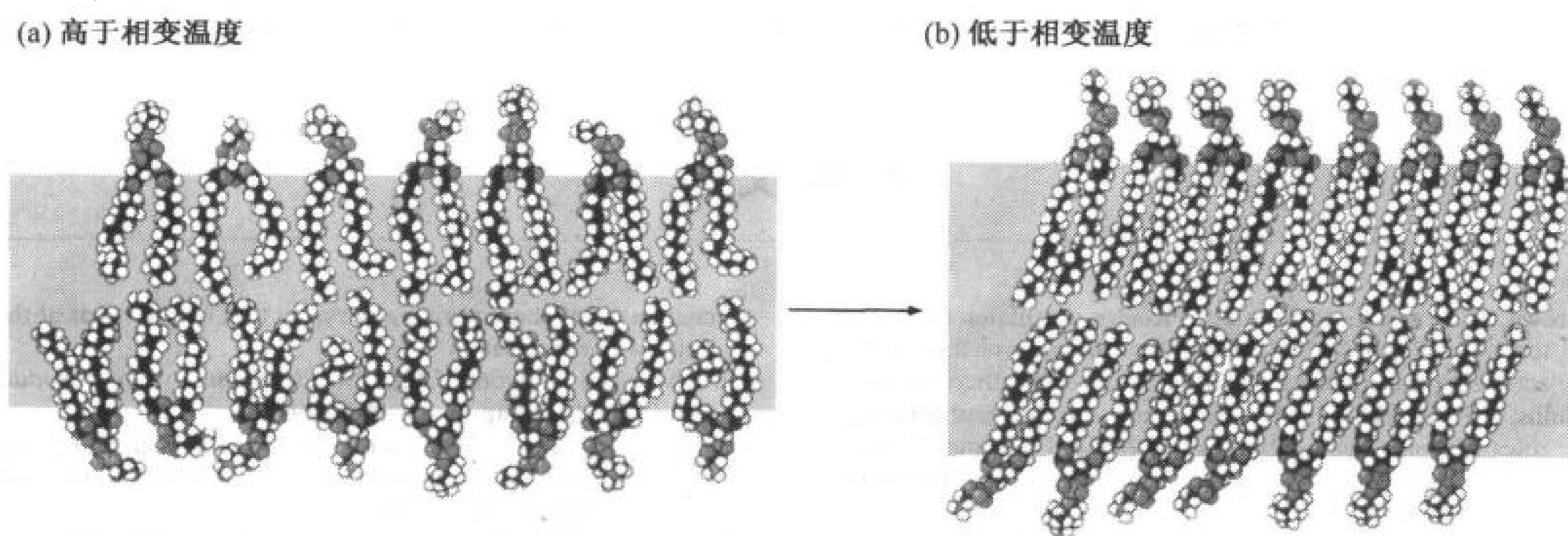


图9-18 脂双层的相转变

(a)高于相变温度时，整个脂分子和其非极性的尾部在双层的平面内高度流动。(b)低于相变温度时，脂分子很有序地排列，形成凝胶状的固体。[引自 Robertson, R.N., The Lively Membranes, pp. 69-70, Cambridge University Press (1983)]

由于脂肪酸的熔点随着烃链长度和饱和度的增加而增加，因此相应的脂双层的相变温度也跟着增加。大多数生物膜的相变温度都在10～40℃之间，细菌和冷血动物(如鱼)可以根据环境温度调节(通过合成和降解脂)膜脂中的脂肪酸组成，从而使流动性维持在恒定的水平上，因此，生物膜的流动性大小是它们重要的生理特征之一。

胆固醇调节膜的流动性

胆固醇自身不能形成脂双层，但其刚性的环结构限制了其他膜脂脂肪酸侧链的运动，因此降低了膜的流动性。胆固醇分子嵌入脂双层的烃链之间阻碍其形成晶体，使膜的相变温度范围变宽。因此，胆固醇是一种膜的可塑剂。

生物膜含有脂和蛋白质，它们相互作用。膜蛋白结构上的特征使它们可以伸入甚至完全穿过脂双层的疏水内部，反过来，膜脂的物理性质也可能受到其中膜蛋白的影响。下一章我们将会看到，通过这种复杂的关系，可以了解到膜的各种功能。

小　结

1. 脂质是一大类种类繁多的分子，溶于有机溶剂，与其他主要的生物分子不同，不形成聚合物。
2. 脂肪酸是链长度和饱和度各异的羧酸。
3. 脂肪细胞和其他细胞储有由三个脂肪酸和一个甘油酯化形成的三脂酰甘油。
4. 甘油磷脂是两亲性分子，包含两个脂肪酸链和一个极性头部基团。
5. 鞘脂包括鞘磷脂、脑苷脂和神经节苷脂。
6. 胆固醇、类固醇激素和维生素 D 都基于一个四环结构。
7. 花生四烯酸的衍生物前列腺素、前列环素、凝血噁烷和白三烯都是信号分子，有很多生理功能。
8. 甘油磷脂和鞘脂通过非极性尾端相互结合，极性头部暴露于水相中形成脂双层。
9. 脂的跨膜横向扩散非常慢，但在脂双层平面内的侧向扩散很快。脂双层的流动性受温度、构成脂肪酸残基的链长度及饱和度的影响。

参考文献

Brown, M.S. and Goldstein, J.L., Koch's postulates for cholesterol, *Cell* **71**, 187–188 (1992). [Describes approaches in characterizing the involvement of cholesterol in atherosclerosis.]

Cullis, R.R. and Hope, M.J., Physical properties and functional roles of lipids in membranes, *in* Vance, D.E. and Vance, J. (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes*, Elsevier (1991).

Gelb, M.H., Jain, M.K., Hanel, A.M., and Berg, O.G., Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolases: lessons from secreted phospholipases A_2, *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 653–688 (1995). [This detailed review includes a description of the challenges of characterizing enzymes that act on lipids at the lipid–water interface.]

Gurr, M.I. and Harwood, J.L., *Lipid Biochemistry: An Introduction* (4th ed.), Chapman & Hall (1991).

Needleman, P., Turk, J., Jakschik, B.A., Morrison, A.R., and Lefkowith, J.B., Arachidonic acid metabolism, *Annu. Rev. Biochem.* **55**, 69–102 (1986).

Pastor, R.W., Molecular dynamics and Monte Carlo simulations of lipid bilayers, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 486–492 (1994). [Discusses the structures and fluidity of lipid bilayers.]

Weissman, G., Aspirin, *Sci. Am.* **264**(1), 84–90 (1991).

关　键　词

脂质　lipid
磷脂酸　phosphatidic acid
神经节苷脂　ganglioside
二十烷类　eicosanoid
脂肪酸　fatty acid
磷脂酶　phospholipase
类固醇　steroid
脂双层　lipid bilayer
饱和度　saturation
溶血磷脂　lysophospholipid
固醇　sterol
脂质体　liposome
三酰甘油　triacylglycerol
缩醛磷脂　plasmalogen
糖皮质激素　glucocorticoid
横向扩散　transverse diffusion
脂肪　fat
鞘脂　sphingolipid
盐皮质激素　mineralocorticoid
侧向扩散　lateral diffusion
油　oil
神经酰胺　ceramide
雄激素 androgen
相变温度　transition temperature
脂肪细胞　adipocyte
鞘磷脂　sphingomyelin
雌激素　estrogen
甘油磷脂　glycerophospholipid
脑苷脂　cerebroside
前列腺素　prostaglandin

学习思考题

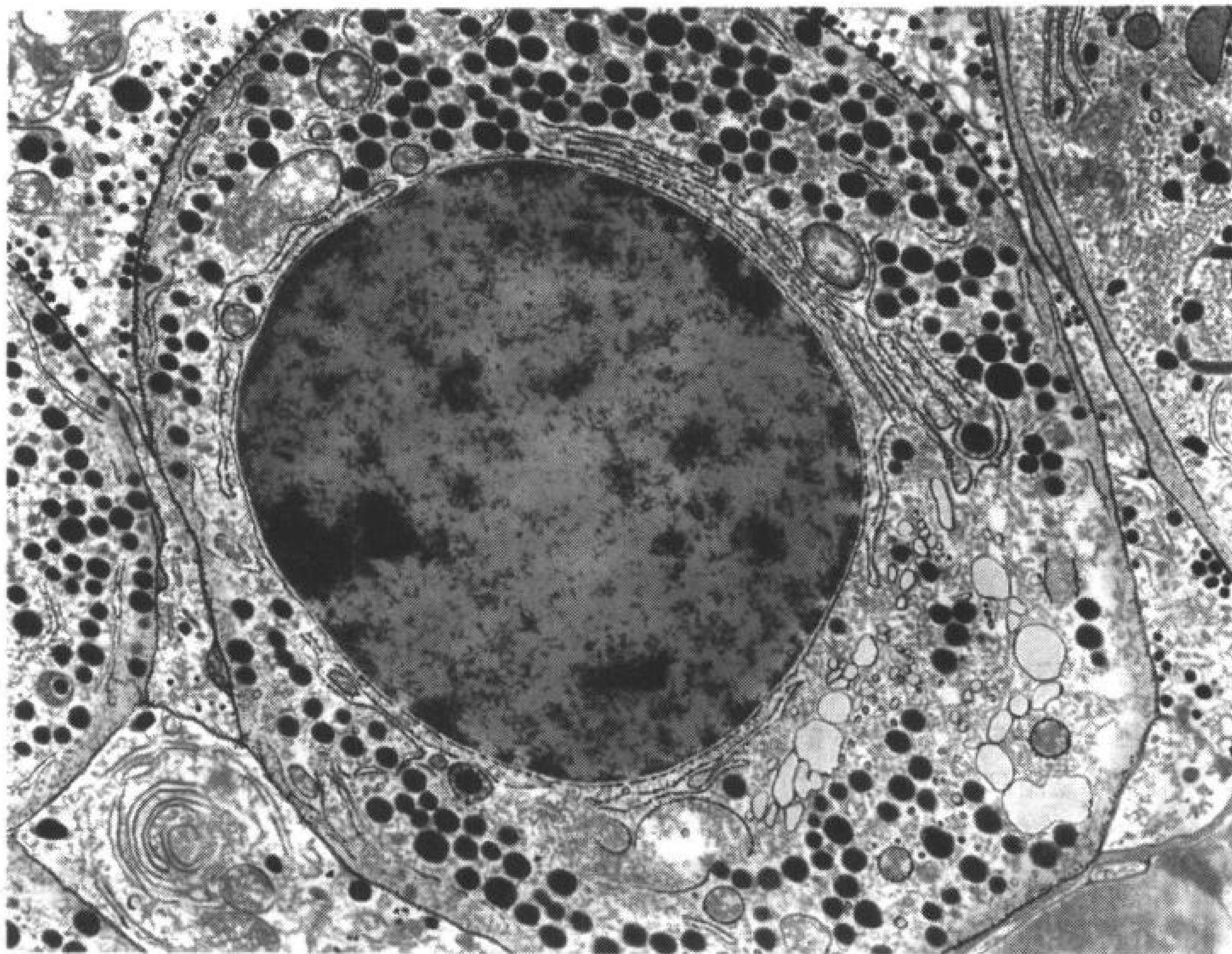
1. 脂质和其他三种主要的生物分子有何区别?
2. 不饱和度对脂肪酸和它们被酯化形成的膜脂的物理性质有何影响?
3. 比较三酰甘油、甘油磷脂及鞘脂在结构和物理性质上的异同点?
4. 总结类固醇和二十烷类的功能。
5. 解释为什么膜脂侧向扩散比横向扩散快?

练 习 题

1. 反式油酸与顺式油酸的熔点哪个更高,为什么?
2. 图 9-1 中的脂肪酸可以组成多少种不同的三酰甘油?
3. 含有 3 个亚油酸残基和含有 3 个硬脂酸残基的三酰甘油氧化时,哪个产生的能量较多?
4. 1-棕榈酰-2-油酰-3-磷脂酰丝氨酸由下列酶水解时分别得到什么产物?
   (a)磷脂酶 A_1,(b)磷脂酶 A_2,(c)磷脂酶 C,(d)磷脂酶 D。
5. 表 9-2 中磷脂酰甘油的心磷脂头部基团伸出脂双层的方式和其他的甘油磷脂头部基团相同吗?
6. 大多数激素,如多肽激素通过结合到细胞表面受体发挥作用。而类固醇激素却结合到细胞质受体上,解释此过程的可能性。
7. 动物不能合成亚油酸(花生四烯酸的一个前体),因此必须从饮食中获取这种必需脂肪酸。解释为什么人工培养的动物细胞没有亚油酸却可以存活。
8. 为什么三酰甘油不是脂双层的主要成分?
9. 为什么仅含有神经节苷脂的脂双层是不稳定的?
10. 当把在 20℃ 生长的细菌加热到 30℃ 时,它们最可能合成含有(a)饱和或不饱和脂肪酸,(b)短链或长链脂肪酸的膜脂。解释原因。

(清华大学 王希成 译 郑昌学 校)

第10章 生 物 膜



细胞膜勾划出分离的新陈代谢隔间，通过嵌合在脂双层中的蛋白质的作用，介导隔间之间的分子和信息的流动。这张垂体腺细胞的电子显微镜照片显示了各种被膜包住的细胞器，包括被高度折叠的内质网所包围（淡绿色曲线）的核（粉红色），线粒体（圆的绿色体）和许多含有分泌激素的泡囊（棕色）。（引自 Questlscience photo Libraryl Photo Researchers）

1．膜蛋白

A．膜内在蛋白

B．脂连蛋白

C．膜外周蛋白

2．膜的结构和组装

A．流动镶嵌模型

B．红细胞膜

C．脂的不对称性

D．分泌途径

3．脂蛋白和受体介导的内吞作用

A．脂蛋白结构

B．受体介导的 LDL 内吞作用

4．跨膜运输

A．运输的热力学

B．介导性运输的机制

C．ATP 驱动的主动运输

D．离子梯度驱动的主动运输

240

脂双层对极性分子的通过提供了一个难以越过的屏障，它分隔两个水溶液隔间的能力，对包围所有细胞的原生质膜和限定真核细胞的细胞器的膜，都具有根本的重要性。这些膜通过分区间隔作用组织生物学过程。脂双层对极性或带电荷分子的非渗透性，使溶质在两侧浓度可具有显著的差别。因此，脂双层界定的隔间能维持特定代谢过程所需的大小分子的补充。然而，以能量和物质（节 1-4E）都是稳态通量并对外部条件变化有反应能力为特征的生物学过程，却又需要某些分子和离子通过脂双层。

*生物膜含有蛋白质和脂。*膜蛋白催化许多化学反应，介导养料和废物的流动，参与胞外环境对各种胞内成分的信息中继。本章我们要细察膜蛋白独特的性质，这些特性使它们能与脂双层的疏水内部相互作用。我们也讨论膜内蛋白质和脂的动力构成以及脂蛋白的结构和功能，最后，我们将介绍各种物质跨膜转运的机制。许多关键性的细胞活动，包括发生在膜上和膜内的氧化磷酸化（第 17 章）和光合作用（第 18 章），它们都依赖膜和膜蛋白的特性。这些内容都将在本章给以介绍。

1. 膜蛋白

*所有生物膜都是由蛋白质结合脂双层基质组成，*尽管脂和蛋白质的确切成分随膜的性质而各异。蛋白质对脂的比例随膜功能的不同变化相当大。例如，包围并隔离某种神经轴突（图 9-8）的富含脂的髓鞘膜，其蛋白质与脂的比为 0.23，而介导许多化学反应的线粒体，其富含蛋白质的内膜蛋白质与脂的比为 3.2。典型的真核细胞的膜有约 50% 的蛋白质。

膜蛋白和其他的蛋白质一样，其大小和形状有很大的差别。但是，根据它们与膜相互作用的方式能大致分为膜内在蛋白、膜外周蛋白及脂连蛋白。

A. 膜内在蛋白

整合性（integral）*或***内源性**（intrinsic）**蛋白质**，*通过疏水相互作用紧紧与膜结合*（图 10-1），*只有用破坏膜的试剂处理，才能把它们分离出来。*这些试剂包括有机溶剂、去污剂（例如十二烷基磺酸钠；节 5-2D）和离液剂（该物质能破坏水结构；节 6-4B）。有些内源性蛋白质结合脂十分坚韧，只有在变性条件下才能将它们游离出来。

膜内在蛋白质在水溶液里倾向于聚集和沉淀，除非用去污剂或与水可混溶的有机溶剂（如丁醇或甘油）方可使其溶解。溶解的膜内在蛋白质可用节 5-2 中讨论的许多蛋白质分离方法来纯化。

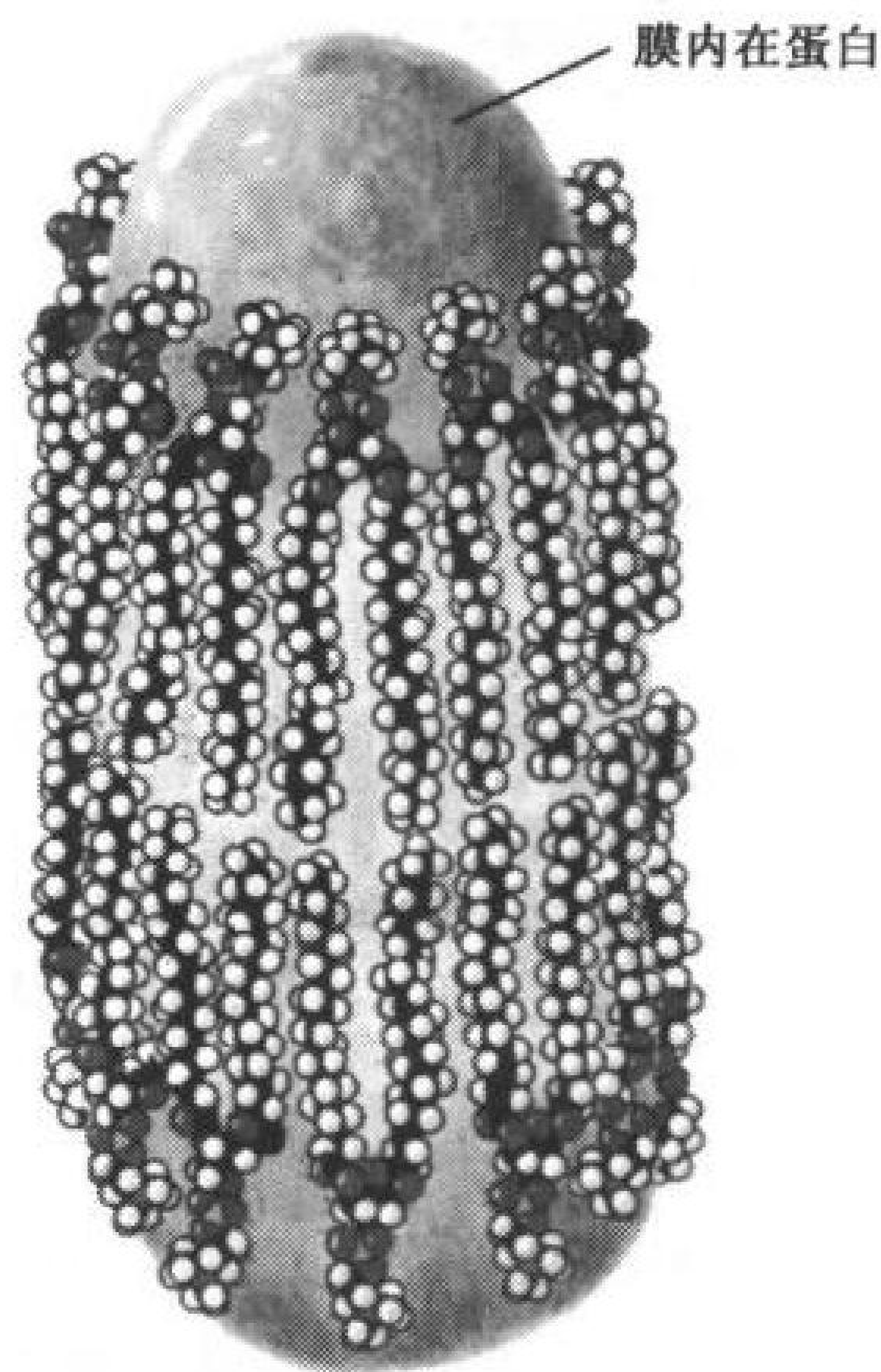


图 10-1　膜内在蛋白的模型

蛋白质通过它和脂的非极性尾之间的疏水相互作用，被膜脂溶剂化，脂的极性头部基团通过氢键和盐桥也可和蛋白质结合。[引自 Robertson, R. N., The Lively Membranes, p. 56. Cambridge University Press (1983)]

241

膜内在蛋白质是不对称的定向两性分子

膜内在蛋白质是两性的，嵌入在膜的非极性内部的蛋白质片段主要具有疏水表面残基，而伸进水溶液

环境的那部分蛋白质大多被极性残基所覆盖。这可通过**表面标记**(surface labeling)显示,这项技术利用了只与蛋白质发生反应,而不透过膜的试剂。例如,膜内在蛋白的细胞外结构域能与其抗体结合,但胞质内结构域则不能与其抗体结合,除非膜被破裂。具有荧光或放射活性标记的专一性蛋白质试剂,可类似地应用于标记显示。或者用蛋白酶消化膜内在蛋白质暴露在溶剂中的部分,由此也能够识别膜内在蛋白质的膜嵌入部分。例如用这些技术发现红细胞蛋白**血型糖蛋白A**(glycophorinA)有3个结构域(图10-2):①72个残基位于外部的N端结构域,该结构域有16条糖链;②一个19个残基的序列,几乎全部由疏水残基组成,它跨越红细胞膜;③由40个残基组成的胞质内C端结构域,该结构域有高比例的带电荷和极性的残基。因此,血型糖蛋白A是一个**跨膜蛋白**(transmembrane protein),即它完全跨越细胞膜。

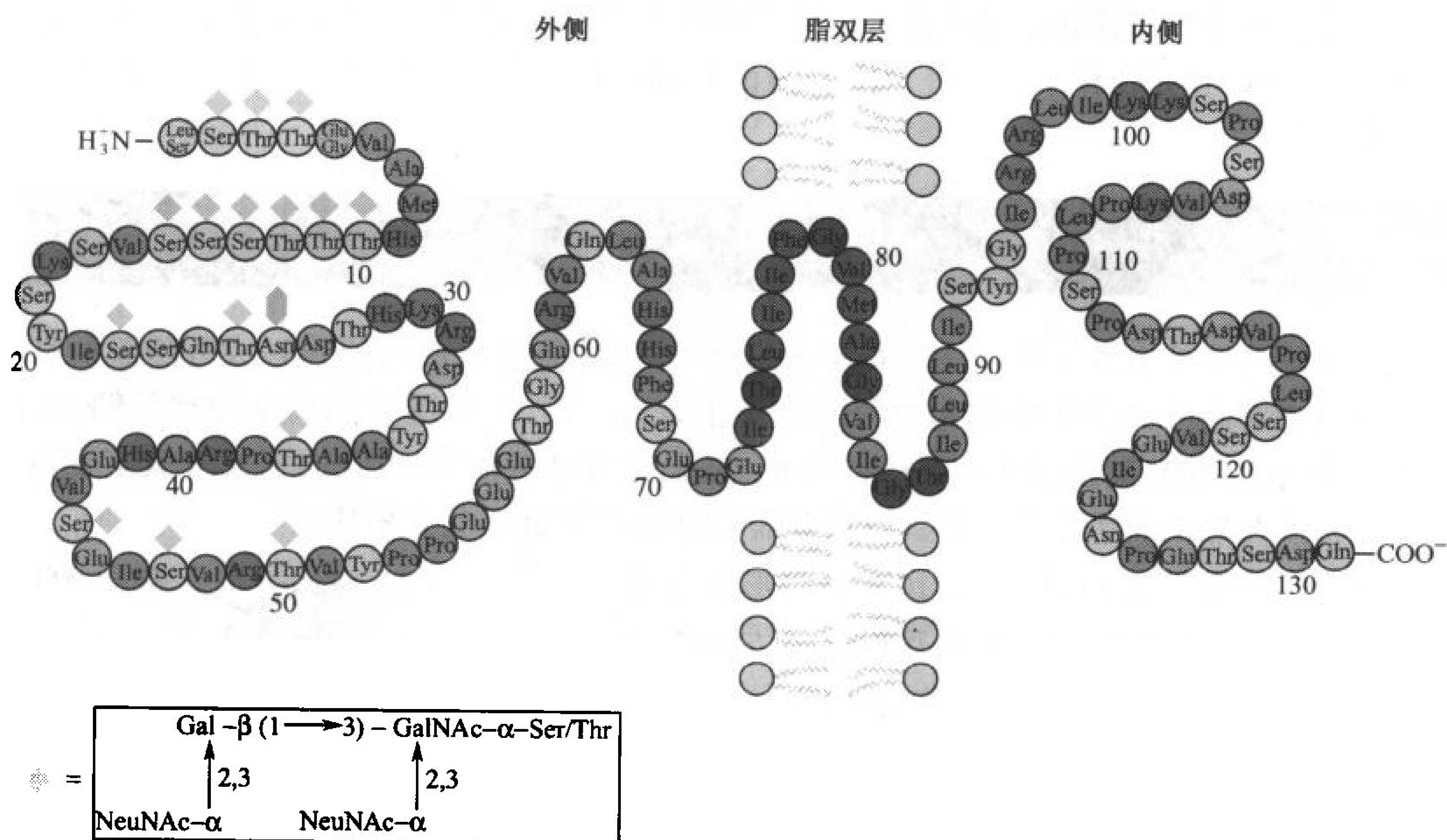


图10-2 人的红细胞血型糖蛋白A

该蛋白在细胞外结构域有15个O-连接寡糖(绿色菱形)和一个*N*-连接寡糖(深绿色六面体)。O-连接寡糖的优先顺序也作显示(Neu NAC为*N*-乙酰神经氨酸)。蛋白的跨膜部分(棕色和紫色)主要由19个连续疏水残基组成。其C端部分位于膜的细胞质一侧,富有阴离子(粉红色)和阳离子(蓝色)残基。有二种普通的血型糖蛋白A遗传变种:血型糖蛋白A^M,1位是Ser,5位是Gly;而血型糖蛋白A^N,1位是Leu,5位是Glu。[引自Marchesi, V. T., Semin. Hematol. 16, 8(1979)]

对多种生物膜的研究表明,生物膜是不对称的,一个特定的膜蛋白只能位于膜特定的一侧,跨膜蛋白对膜而言则只能定向在一个方向上。然而,已知的蛋白质没有一个是完全包埋在膜中的,即膜结合蛋白至少部分暴露在水环境中。

242

血型糖蛋白A的跨膜结构域和许多膜内在蛋白一样,几乎都形成α-螺旋,因此它的多肽主链要满足氢键的需要。血型糖蛋白A的单个跨膜螺旋的存在,可通过计算自由能的变化来预测,即α螺旋肽片段从膜的非极性内部转移到水中的自由能变化(图10-3),或者更简单地用表6-2中的氨基酸的亲水/疏水指数来鉴定疏水肽段。其他膜内在蛋白的类似分析鉴定了它们的膜嵌入螺旋。

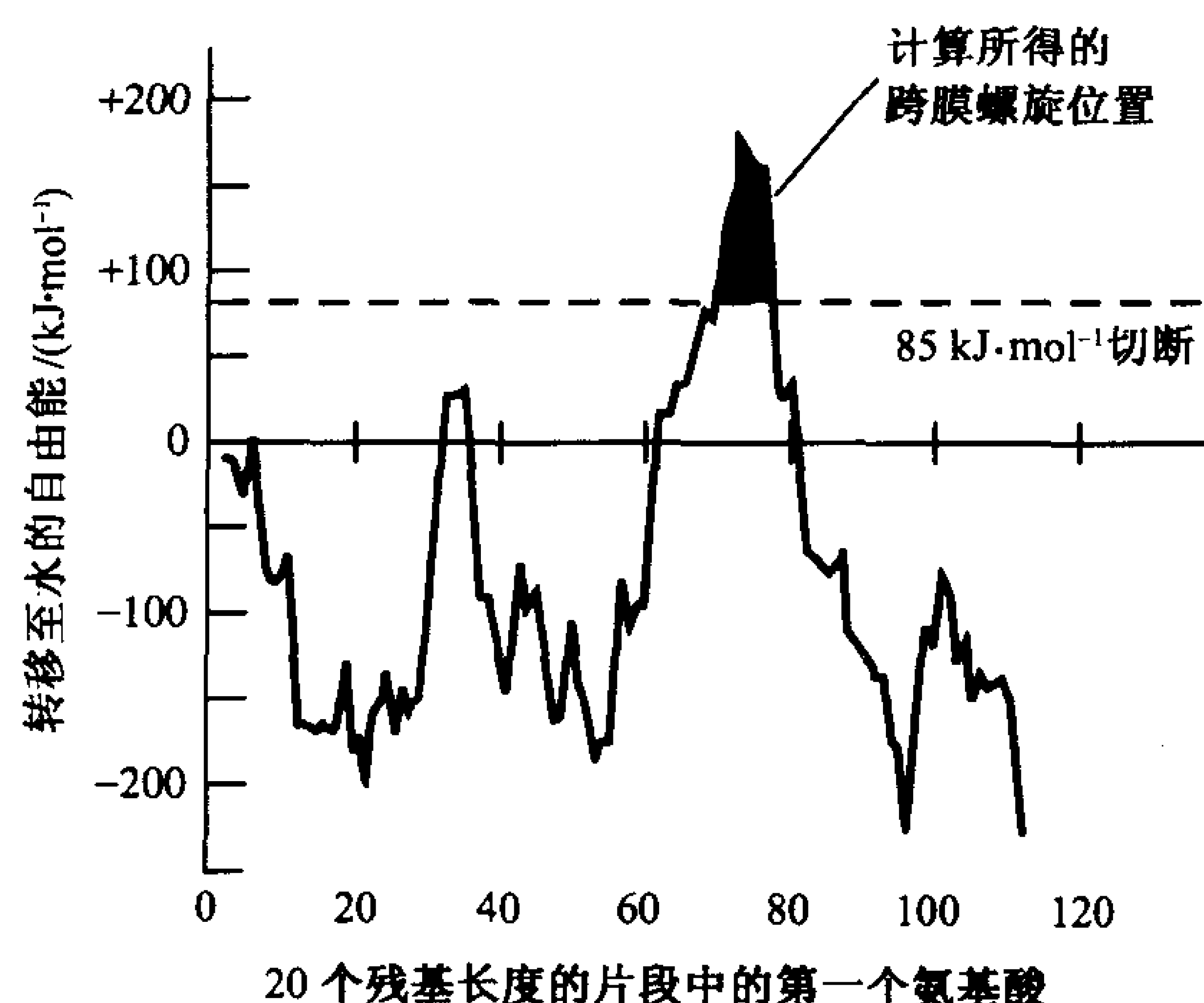


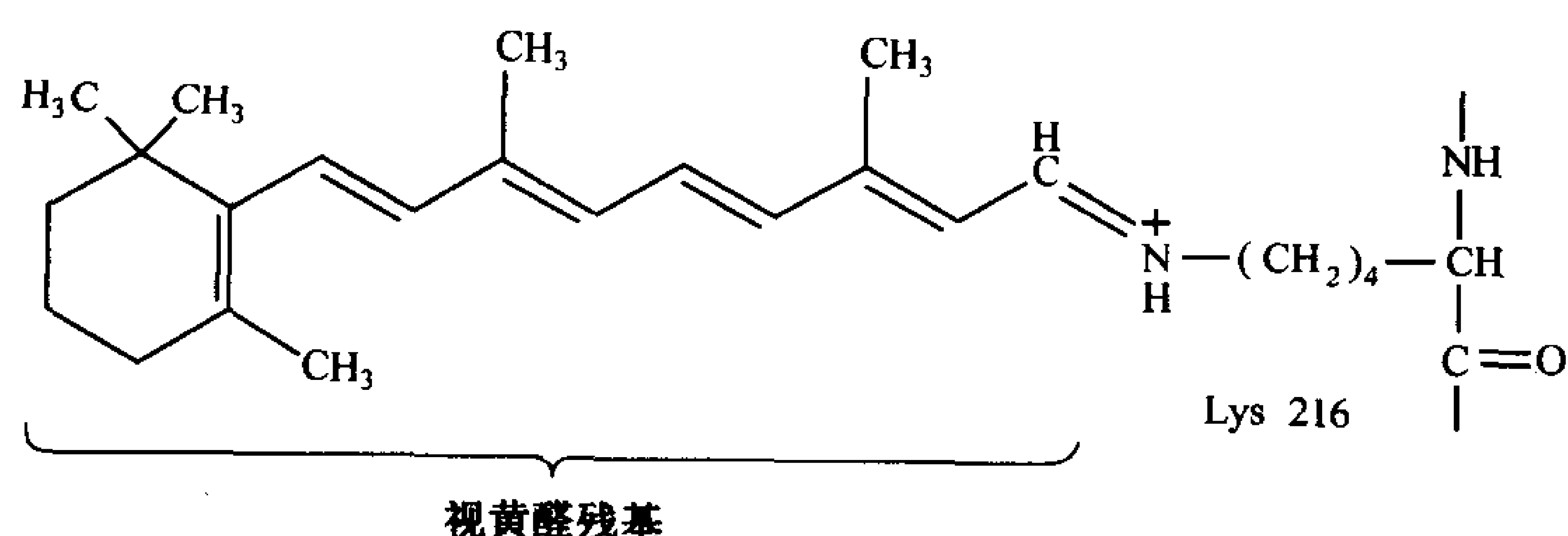
图 10-3　血型糖蛋白 A 的跨膜结构域鉴定

从膜内部转移 20 个残基长度的 α-螺旋片段到水中的自由能变化计算值对各片段的第一个残基作图。峰高大于 $+85kJ\cdot mol^{-1}$ 表明有一个跨膜螺旋。[引自 Engleman. D. M., Steitz, T. A., and Goldman, A., Annu. Rev, Biophys. Biophys. Chem. 15, 343 (1986)]

含 7 个跨膜片段的细菌视紫红质

243

许多膜蛋白,如**细菌视紫红质**(bacteriohodopsin)(图 10-4),含有多个跨膜 α-螺旋。细菌视紫红质,一个有 247 个残基的蛋白质,从嗜盐细菌 *Halobacterium halobium*(在 $4.3mol\cdot L^{-1}$ NaCl 生长最好)中分离得到,它是一个光驱动的质子泵:它产生一个跨膜的质子浓度梯度,提供合成 ATP 的能量,其机制在节 17-3 中讨论。细菌视紫红质的光吸收基团为**视黄醛**(retinal),它共价连接在蛋白质的 216 位的 Lys 上,也是视觉的光敏感元件。



细菌细胞膜具有约 0.5μm 宽的斑块,称为紫膜,它由 75% 的细菌视紫红质和 25% 的脂所组成。这个蛋白质分子排列成高度有序的二维阵列(二维结晶),间隙由脂充满。Richard Henderson 和 Nigel Unwin 利用这一不寻常的膜结构测定了细菌视紫红质的结构。他们应用了**电子晶体学**(electron crystallography),一种类似 X 射线结晶学的技术,利用电子显微镜的电子束从二维晶体中引发出衍射。

细菌视紫红质主要由一束 7 个 α 螺旋杆所组成。每个 α 螺旋约含 25 个氨基酸残基,它们以几乎垂直于脂双层平面的方向跨越脂双层(图 10-4)。正如所料,与脂尾部接触的氨基酸侧链是高度疏水的。个别跨膜螺旋通过不同大小的亲水环以头尾相接的方式相连接,这种排列使膜表

面附近的蛋白质带电残基和水溶液环境接触。

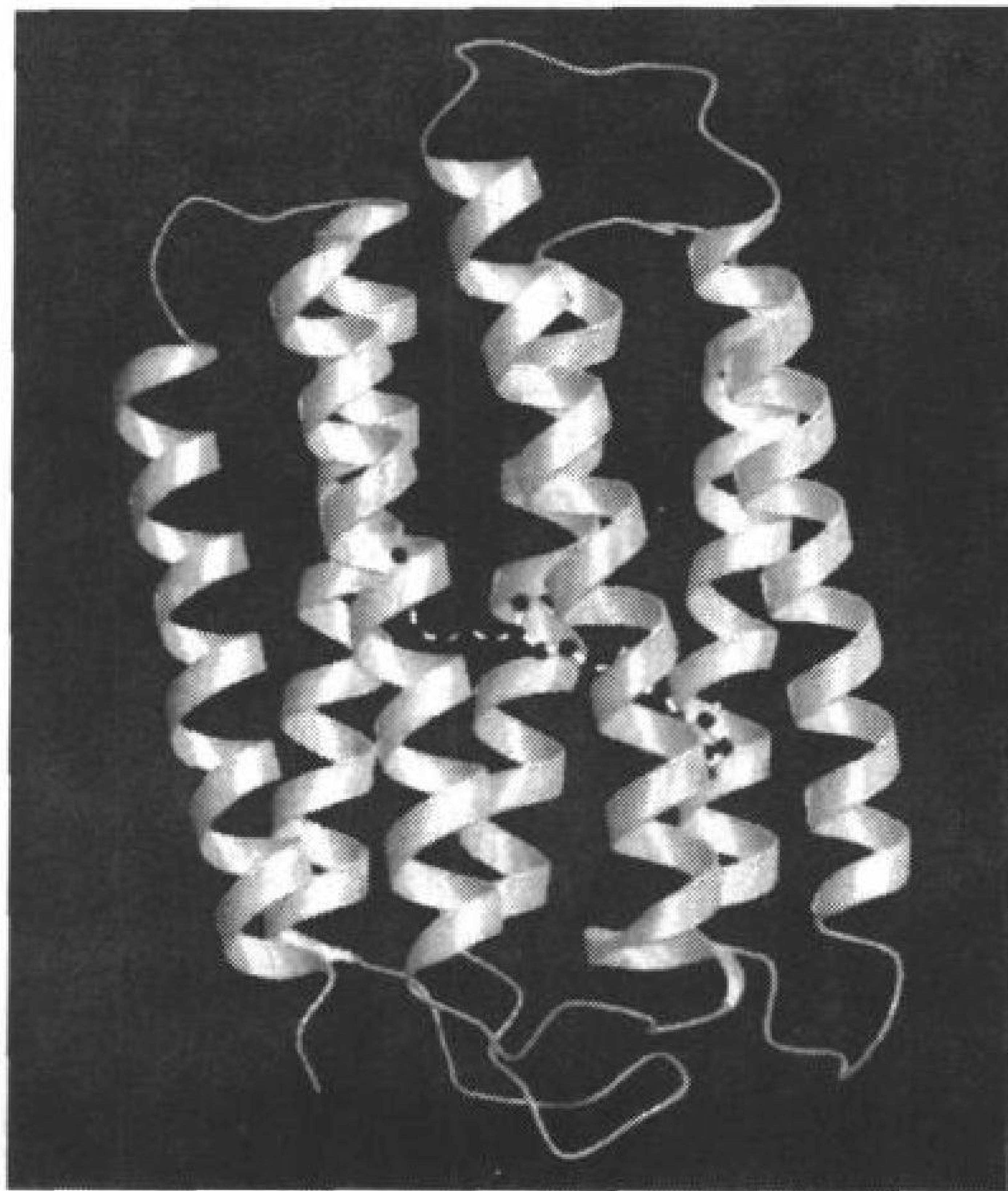


图 10-4 细菌视紫红质的结构

从膜平面内观察,蛋白呈缎带形式(青色),共价结合的视黄醛以球-棒形式表示。(引自 N. Grigorieff and Richard Henderson, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, England)

243

光合反应中心含有 11 个跨膜螺旋

紫色光合细菌的原发光化学过程是由所谓的**光合反应中心**(photosynthetic reaction center)介导的(节 18-2B)。这个跨膜蛋白至少有 3 种不同的、各约 300 个残基的亚单位所构成,这些亚基集体结合 4 个**叶绿素**(chlorophyll)分子、4 个其他的发色团和一个非血红素铁原子。1984 年,Hartmut Michel、Johann Deisenhofer 和 Robert Huber 测定了 *Rhodopseudomonas viridis* 的光合反应中心的 1187 个残基的 X 射线结构,这是首次在原子细节上描述的跨膜蛋白(图 10-5)。这个蛋白的跨膜部分,由 11 个 α 螺旋构成 45Å 长的具有预期疏水表面的圆柱体。

244

疏水相互作用(节 6-4)是稳定水溶性球蛋白三维结构的主要作用力。然而,因为膜内在蛋白的跨膜区是处于在非极性的环境中,靠什么来稳定它们的结构呢?分析光合反应中心,表明它的内部残基具有相当于水溶性蛋白的疏水性,然而光合反应中心暴露在膜外的残基平均比内部残基更为疏水,因此,*膜内在蛋白和水溶性蛋白之间的差别只是表面的:它们的内部是相似的,但是它们的表面极性是与其环境的极性相一致的*。

膜孔蛋白具有跨膜 β-桶状结构

嵌入膜的非极性内部的蛋白质肽段一定是折叠的,从而满足多肽主链的氢键势。α 螺旋如此,卷成桶状的反平行 β 折叠也是如此(αβ 桶见节 6-23)。这种 β-结构存在于**膜孔蛋白**(porin)中,它是革兰氏阴性细菌(节 8-3B)外膜中的通道形成蛋白。外膜保护细菌不受宿主环境伤害,而膜孔蛋白则允许营养物之类的小的极性溶质进入,真核生物的线粒体和叶绿体外膜也存在膜孔蛋白(与这些细胞器来自自由的活细胞一致,节 1-3B)。

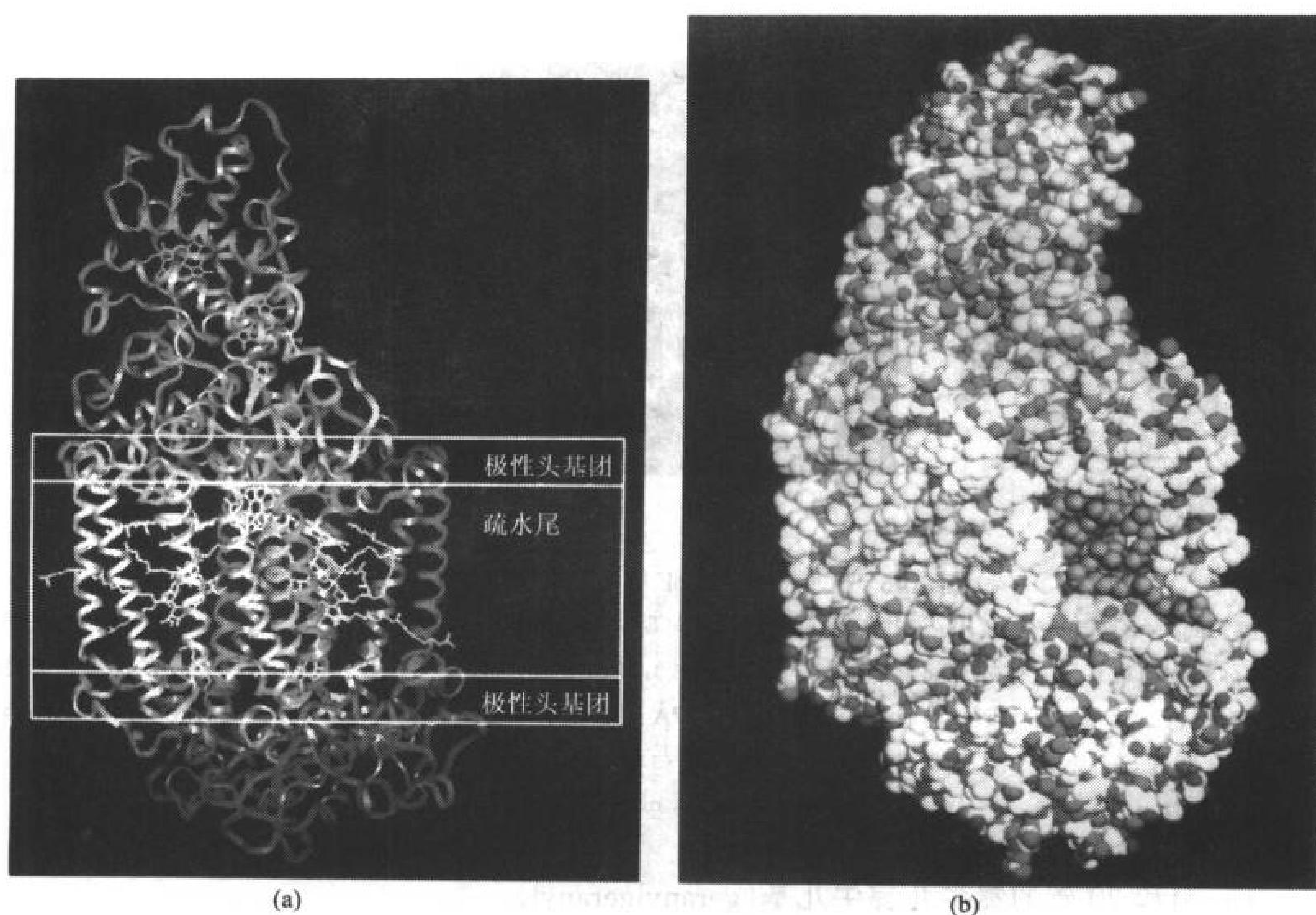


图 10-5　*Rhodopseudomas viridis* 光合反应中心的 X 射线结构

(a) 缎带示意图仅显示 α 碳主链和光吸收基团(黄色)。H、M 和 L 亚基(分别为粉红、蓝色和橙色)集合形成 11 个跨膜螺旋细胞色素 *c*(绿色)结合在复合物的外表面。设想的跨膜蛋白在脂双层里占据的位置见图示。[引自 Johann Deisenhofer, Robert Huber, and Hartmut Michel, Max-Planck-Institut für Biochemie, Germany](b) 空间填充模型,在这模型里氮原子是蓝色,氧是红色,硫为黄色。H、M、L 和细胞色素亚基分别着以粉红、蓝、橙和绿色,发色团的暴露部分着以棕色。注意,极少的极性基团(氮和氧)暴露在嵌入脂双层非极性部位的蛋白的外部。[引自 Deisenhofer, J. and Michel, H., Les Prix Nobel(1989)]

细菌膜孔蛋白是单体,或者是相同的 30～50kDa 亚基的三聚体。X 射线结构研究表明:每个膜孔蛋白亚基主要由 16～18 股反向平行 β-桶构成,此 β-桶形成了一个长约 55Å、最小直径约为 7Å 的溶剂可及的中心通道(图 10-6)。如所料想的那样,暴露于膜表面的蛋白的侧链都是非极性的,从而形成一个 27Å 高的疏水带,环绕三聚体(图 10-6c)。相反,暴露于溶剂中的蛋白质侧链,包括水溶液通道的衬壁蛋白质残基都是极性的。膜孔蛋白对溶质选择性的可能机制将在节 10-4B 中讨论。

B. 脂连蛋白

有些膜结合蛋白含有共价键连接的脂,这些脂将蛋白质锚定在膜上。脂像任何改良基团一样,能介导蛋白质-蛋白质相互作用,并改良与之连接的蛋白质的结构和活性。**脂连蛋白**(lipid-linked protein)有 3 种:异戊烯化蛋白、脂酰化蛋白和糖基磷脂酰肌醇连接蛋白。单个蛋白质可包含一个以上共价连接的脂基团。

异戊烯化蛋白(prenylated protein)有共价连接的脂,该脂是由**异戊二烯单位**(isoprene unit)所构成(**异戊二烯**是一个五碳化合物)。最常见的**类异戊二烯基**(isoprenoid group)是 15 碳的**法**

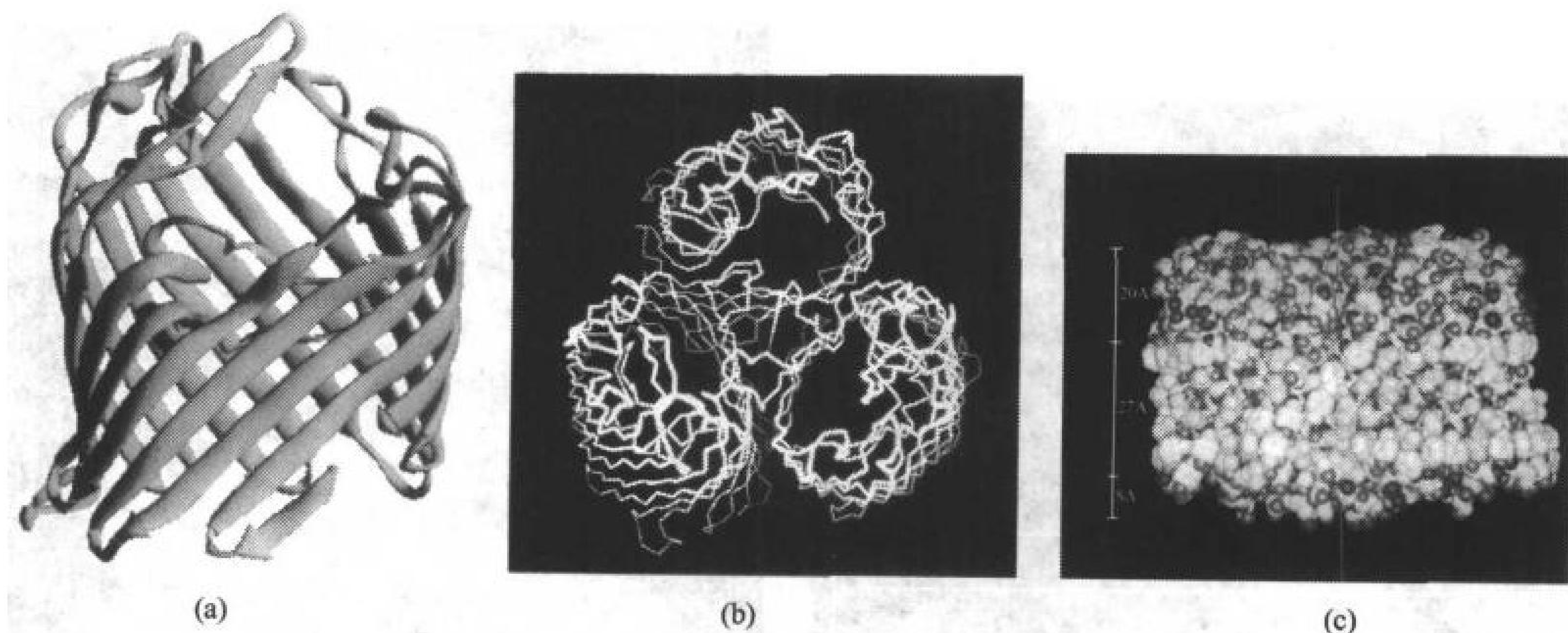
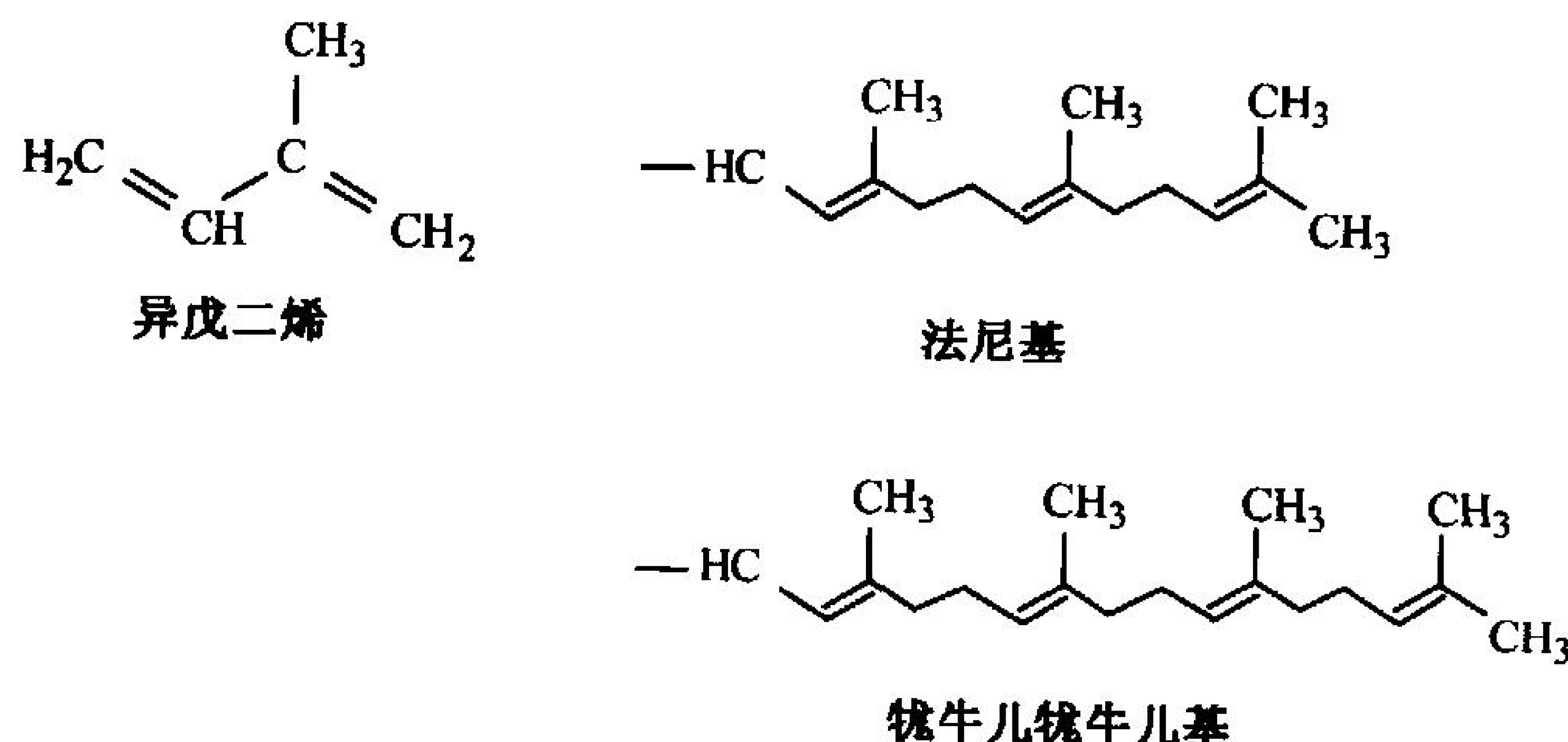


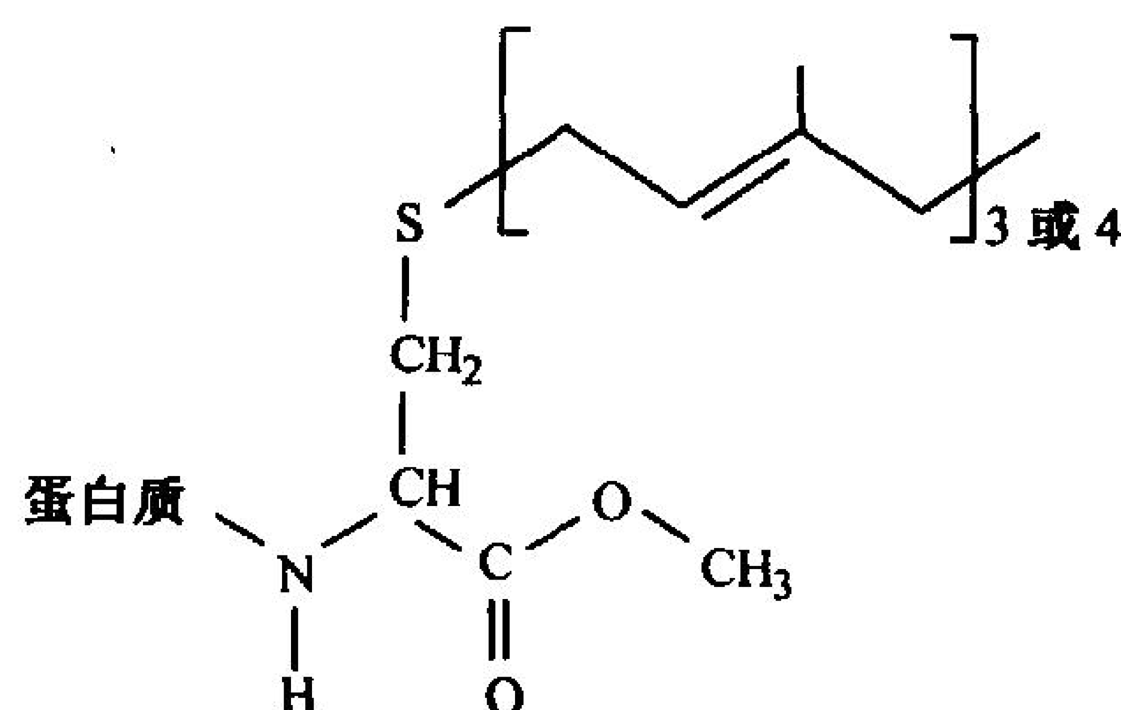
图 10-6　大肠杆菌 OmpF 膜孔蛋白的 X 射线结构

(a) 16 股单体的缎带示意图；(b)从三重对称轴约 30°方向观察三聚体 α 碳主链，表明孔通过每个亚基；(c)从垂直于三重对称轴方向观察三聚体的空间填充模型(垂直的绿线)，N 原子蓝色，O 原子红色，C 原子黄色，芳香族残基侧链的原子为白色。芳香族基团似乎构成了一个界定为约 27Å 高的疏水带(刻度表示于左边)，它浸没在细菌外膜的非极性部分(a和c的顶部处于细胞外表)，将此疏水带与图10-5(b)进行比较。(引自 Tilman Schirmer 和 Johan Jansonius, University of Basel, Switgerland)

尼基(farnesyl)和 20 碳的**牻牛儿牻牛儿基**(geranylgeranyl)。



蛋白质中最普通的异戊烯化位置是 C 末端四肽 C-X-X-Y，C 是 Cys 而 X 通常是脂肪族氨基酸，残基 Y 影响异戊烯化的类型：当 Y 是 Ala、Met 或 Ser 时，蛋白质被法尼化；当 Y 是 Leu 时蛋白被牻牛儿牻牛儿化。上述两种情况中，异戊烯基团通过硫醚键酶促连接在 Cys 的硫原子上，然后 X-X-Y 三肽经蛋白质水解作用被切除，新暴露出来的羧基被甲基酯化，产生如下结构的 C 末端。



肉豆蔻酸和棕榈酸这两种脂肪酸和膜蛋白连接。肉豆蔻酸，一种生物学上稀有的饱和 14 碳脂肪酸，通过酰胺键和 N 端 Gly 残基的 α-氨基连接从而挂在蛋白质上。**肉豆蔻酰化**(myristoylation)作用是稳定的：这个脂肪酰基团终生保持连接在蛋白质上。**肉豆蔻酰化**的蛋白质在许多亚细胞隔间中存在，包括细胞质、内质网、原生质膜和核。

在**棕榈酰化作用**(palmitoylation)中，饱和的十六碳脂

肪酸、棕榈酸，以硫酯键连接在特定的 Cys 残基上，棕榈酰化的蛋白质几乎只存在于原生质膜的细胞质一面，在这里许多都介导跨膜信号传递。棕榈酰基通过**棕榈酰硫酯酶**（palmitoyl thioesterase）的作用能够被除去，这提示这种可逆的棕榈酰硫酯酶的作用可能是调控蛋白质与膜的结合，从而调节信号过程。

糖基磷脂酰肌醇连接蛋白（GPI-linked protein）存在于所有真核生物中，在某些寄生性原生动物中尤为丰富，这些原生动物只有相当少量的被跨膜多肽片段锚定的膜蛋白。像糖蛋白和糖脂一样，GPI 连接蛋白只存在于原生质膜的外表面。

GPI 基团的核心结构是由磷脂酰肌醇（表 9-2）经糖苷键连接于一线形四糖组成，这个四糖由 3 个甘露糖残基和一个葡糖胺残基所组成（图 10-7）。在此组合中的非还原端甘露糖与一个磷酸乙醇胺残基形成磷酸二酯键，磷酸乙醇胺是通过酰胺键连接在蛋白质 C 末端羧基上。核心四糖一般可被各种糖残基替代，这些糖残基随蛋白质的特性各不相同。磷脂酰肌醇基团的脂肪酸残基同样也具有多样性。　246

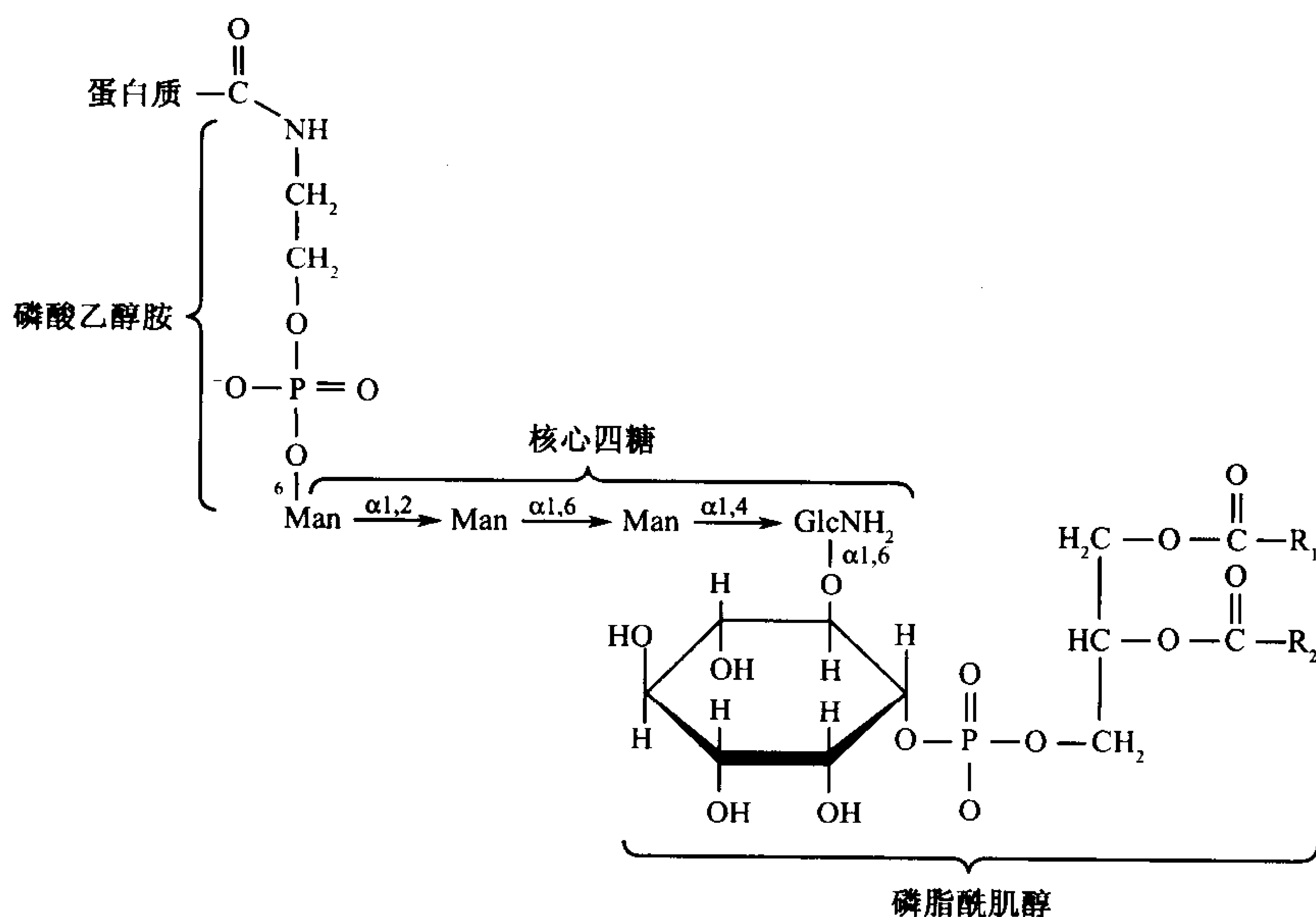


图 10-7　GPI 锚定的蛋白质的核心结构
R1 和 R2 代表脂肪酸残基，随蛋白质特性而变化。四糖也有多种糖残基形式，其特性各不相同。

C. 膜外周蛋白

外周（peripheral）或**外表**（extrinsic）**蛋白**和膜内在蛋白或脂连蛋白不同，通过比较温和的方法能从膜上解离出来，留下完整的膜，例如暴露在高离子强度的盐溶液中或 pH 变化。外周蛋白不结合脂，一旦被纯化，其行为和水溶性蛋白质相似。通过它们的表面结合与膜发生联系，如同内源性蛋白，通过静电或氢键相互作用和膜结合。细胞色素 *c*（节 5-4A 和节 6-2c）是一个外周蛋白，它与线粒体内膜的外表面结合。

2. 膜的结构和组装

人们曾经认为膜是由两层非折褶型多肽之间夹入磷脂双层所组成。这种夹心模型(三明治模型)在热力学基础上不太可行,通过**冰冻断裂电镜**(freeze-fracture electron microscopy)发现跨膜蛋白的事实,进而使这种三明治模型不可信。用冰冻断裂技术时,冰冻在液氮(-196℃)中的膜往往以双层小叶间撕裂的方式被毁坏(图 10-8a)。这一技术的进一步精心发展被称为**冰冻蚀刻**(freeze-etching),即邻近断裂区的被一些冰封住的膜外表面在-100℃下升华(蚀刻)而被暴露(图 10-8b)。从这些冰冻断裂和冰冻蚀刻的膜的电子显微照片(图 10-9)发现,膜的内表面散布着膜内在蛋白的球状颗粒,而膜外表面有相对平滑的外观,因为膜内在蛋白并不在膜外表面中突入很远。

247

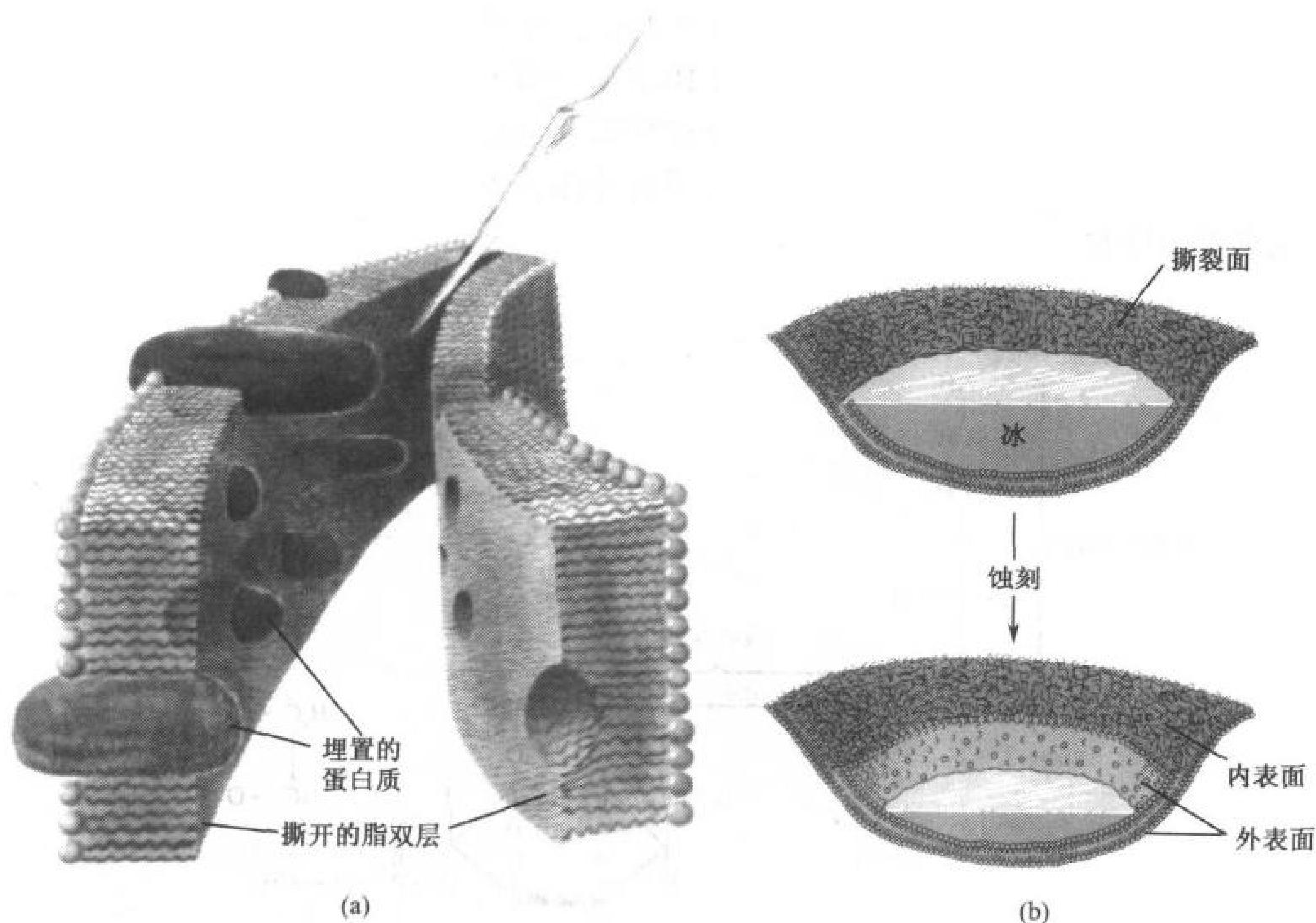


图 10-8 冰冻断裂和冰冻蚀刻技术

(a) 冰冻断裂撕开的膜,暴露出脂双层的内部和埋入其中的蛋白质。(b) 冰冻蚀刻过程中,冰封住的冰冻断裂膜(顶部)部分升华,露出外膜表面(底部)的电子显微照片。

248

A. 流动镶嵌模型

人造脂双层(节 9-2B)流动性的展现,启示生物膜有类似的性质。这种想法是在 1972 年由 S. Jonathan Singer 和 Garth Nicolson 提出的,他们统一地被称为**流动镶嵌模型**(fluid mosaic model)的膜结构理论。在这个模型里,膜内在蛋白被视为"冰山"飘浮在一个二维的脂"海"里(图 10-10)。这一模型的关键原则是膜内在蛋白能在脂基质中侧向扩散,除非它们的运动因和细胞中的其他成分结合而受到约束。膜流动模型解释了 Michael Edidin 早些时候的实验结果,他融合两

种培养细胞，发现不同标记的细胞表面蛋白发生了搀和(图 10-11)。

蛋白质在膜中的扩散速度可用**荧光光漂白恢复测量法**(fluorescence photobleaching recovery)测量。将**荧光基团**(flaorophore)专一性地结合在固定化细胞或人造膜体系的膜组分上，强激光脉冲被聚焦在一个很小的面积(约 $3\mu m^2$)上，破坏(漂白)该处的荧光基团(图 10-12)。荧光在漂白区域内的恢复速率，可用荧光显微镜监测，荧光恢复的速率表明未被漂白和漂白的标记荧光基团分子侧向扩散进出漂白区的速度。

荧光漂白恢复测定显示，膜蛋白的侧向扩散速度是变化的，约有 30%～90%的蛋白质是自由流动的，其扩散速度只比小得多的脂的扩散速度小一个数量级或更慢些，因此它们能在 1 小时内扩散真核细胞的 $20\mu m$ 长度。其他蛋白质的扩散更慢，有些蛋白质由于亚膜连接，实质上是不流动的。

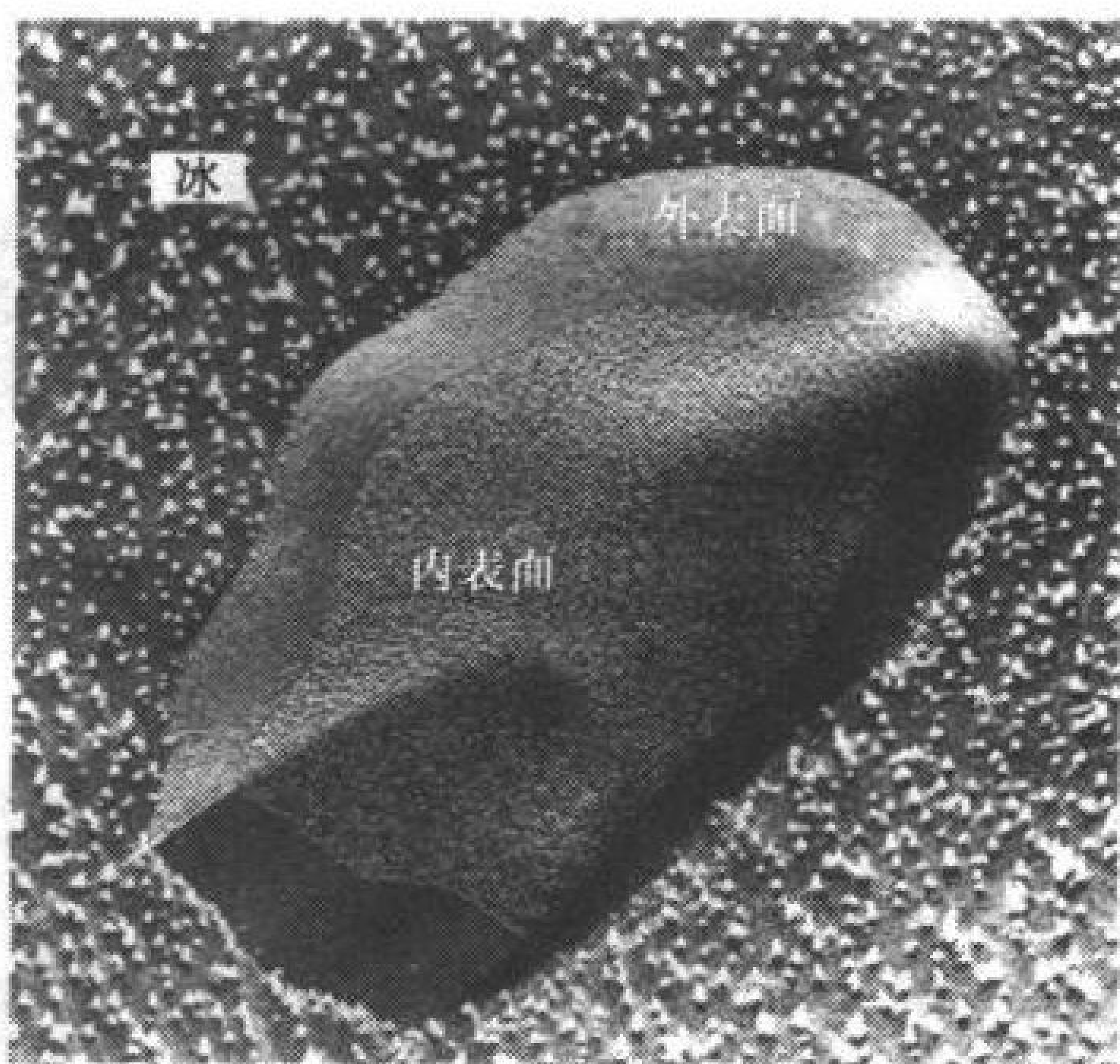


图 10-9　人红细胞原生质膜的电子显微照片
样品被冰冻断裂，然后冰冻蚀刻，展现膜的外(极性)侧面，暴露出来的膜的内表面散布着许多 50～85Å 直径的膜内在蛋白球状颗粒。外表面看来比内表面(非极性)平滑，因为蛋白质突入外部膜表面不很远。
(引自 Vincent Marchesi, Yale University)

250

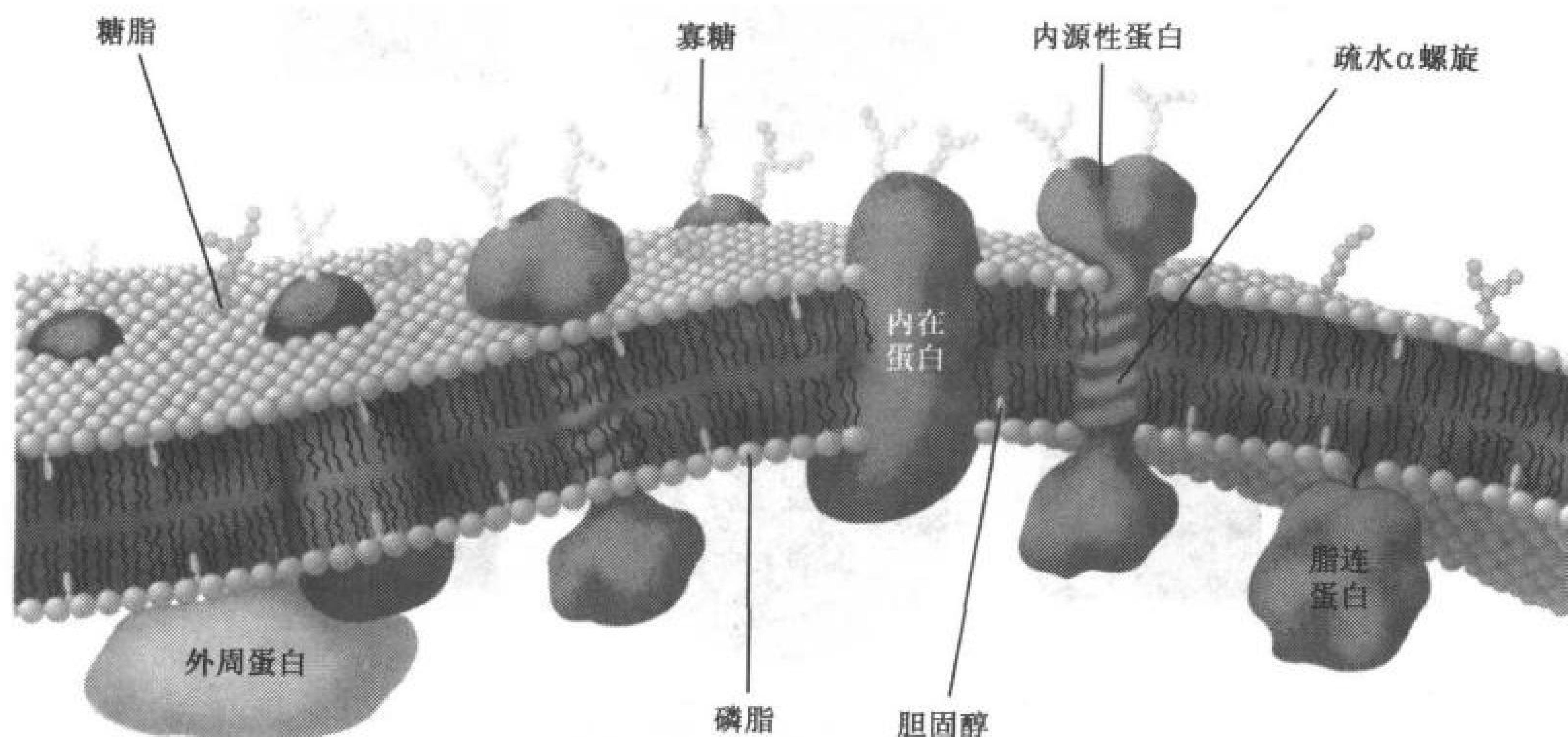


图 10-10　原生质膜的示意图
膜内在蛋白(橙色)镶嵌在由磷脂(蓝色头部基团连接摆动的尾部)和胆固醇(黄色)构成的脂双层里，糖蛋白和糖脂的糖成分(绿色和黄色小珠)仅存在于膜的外表面。

B. 红细胞膜

红细胞膜的相对简单、可获得和易于分离，使它得到最广泛的研究，并成为被了解得最好的生物膜，因此红细胞膜成为其他类型细胞更复杂膜的一个模型。成熟的哺乳动物红细胞没有细胞器，只进行很少数的代谢过程，基本上是一个血红蛋白的膜状包袋。红细胞膜能通过导致细胞内容物泄漏的渗透溶胞而获取，细胞质渗漏后的膜粒子被称为红细胞**血影细胞**(ghost)，这是因

251

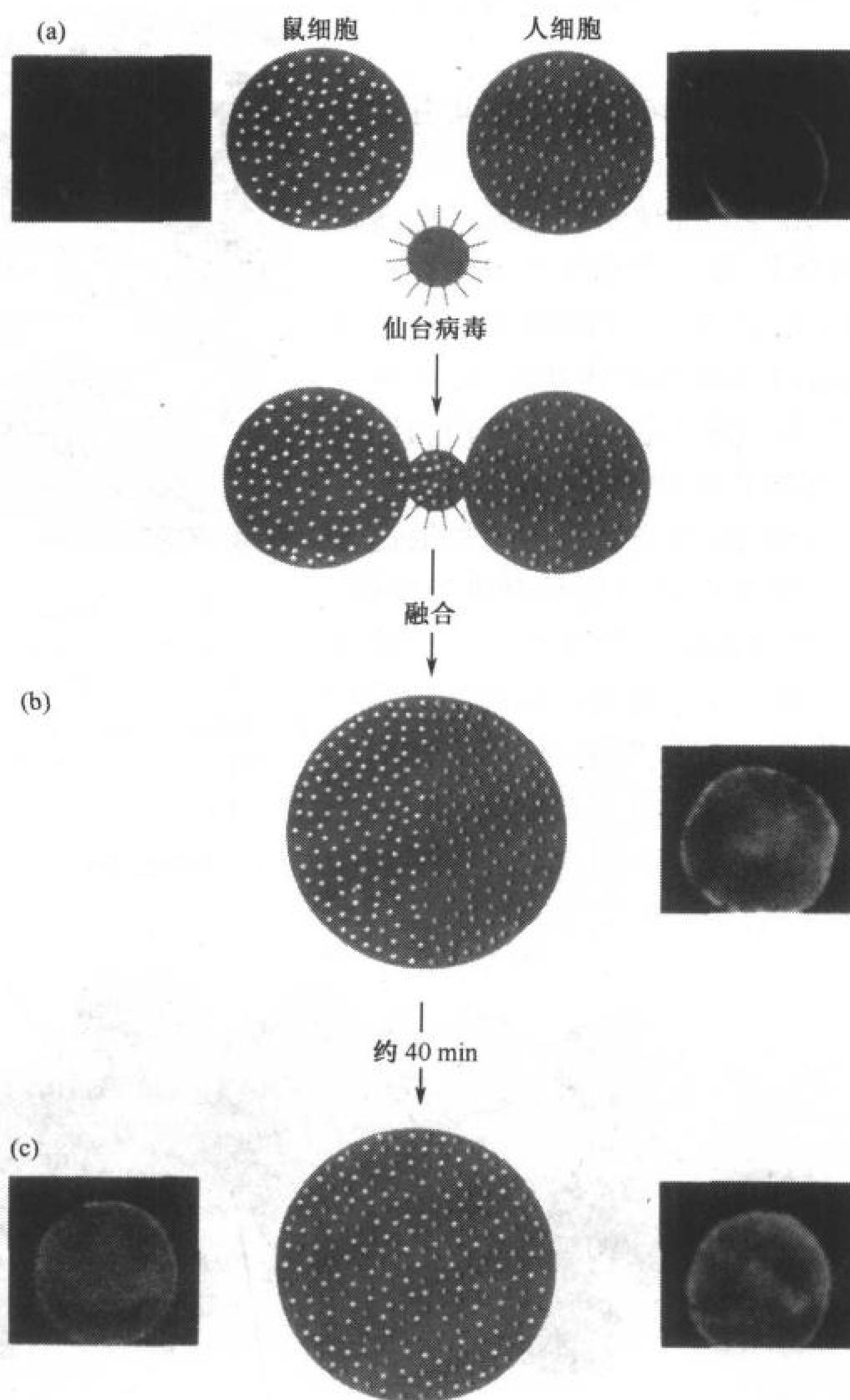


图 10-11 鼠和人细胞的融合

(a) 培养的鼠和人细胞的表面蛋白，分别标以绿色和红色荧光标记，这两类细胞经仙台病毒处理融合，形成被称为异核体的杂交细胞。(b) 融合后的即刻，鼠和人的蛋白质仍是分离的。(c) 然而在 37℃ 下 40min 后，红色和绿色标记完全相混。用仅仅使红色和绿色光进入相机的滤光片，拍摄的光显微照片 b 是双重曝光，c 是同一细胞。

为回复到生理条件下，它们会重新密封形成没有细胞质但维持原有形状的无色颗粒。

红细胞膜包含多种蛋白质

红细胞膜的蛋白质首先经 1％SDS 溶液溶解，用 SDS-PAGE 分离（节 5-20），产生的人红细胞膜电泳图谱用**考马斯亮蓝**（Coomassie brilliant blue）（染蛋白质）或**过碘酸希夫试剂**（periodic *acid*-Schiff's reagent, PAS）（染糖类）染色时，显示出许多蛋白质条带（图 10-13）。相应于区带 1、2、

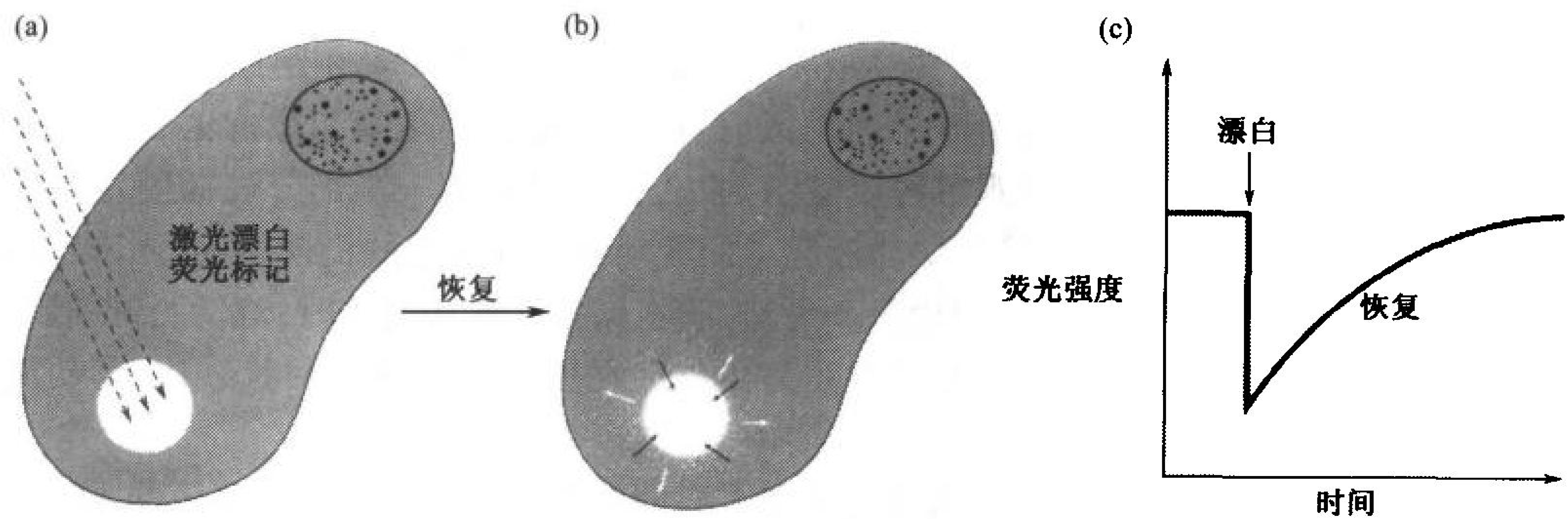


图 10-12　荧光光漂白恢复技术

(a) 强激光脉冲漂白荧光基团标记的固定细胞的(绿色)一个小区,此固定化细胞具有荧光基团标记的膜组分。(b) 当被漂白分子扩散出去、未受损的荧光分子扩散进入该小区时,漂白区的荧光恢复。(c) 荧光恢复速率依赖于标记分子的扩散速率。

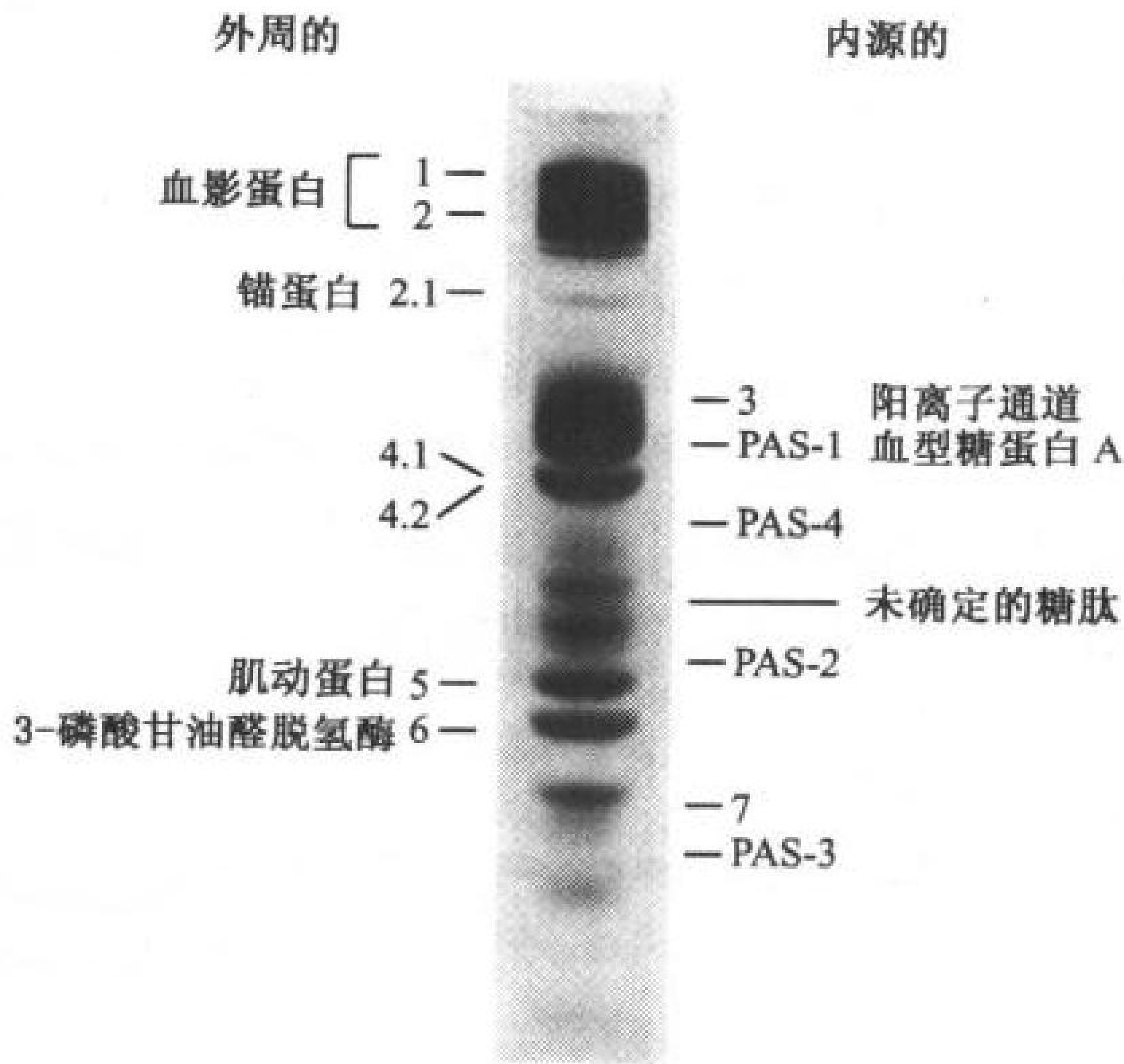


图 10-13　人红细胞膜蛋白的电泳图谱

继 SDS-PAGE 之后,蛋白质经考马斯亮蓝染色,为简单起见,次要区带没有标出,标明了 PAS 染色的 4 个糖蛋白的位置。GAPDH 是糖酵解酶,即 3-磷酸甘油醛脱氢酶。(引自 Vincent Marchesi, Yale University)

4.1、4.2、5 和 6 的多肽通过离子强度或 pH 的变化,容易从膜里提取,因此是外周蛋白。这些蛋白位于膜的内侧,这和完整的红细胞或密封的空壳细胞与蛋白水解酶或膜不渗透性蛋白标记试剂培育所观察到它们不变化的结果相一致。然而,如果漏渗的空壳细胞用同样方法处理,这些蛋白质就会发生变化。

相比之下,相应于膜内在蛋白的带 3、带 7 和 4 条 PAS 区带,只有用去污剂或有机溶剂提取,才能从膜里释放出来。带 3 蛋白占膜蛋白量的 30% 以上(每个细胞约有一百万个分子),是便于 HCO_3^- 跨膜运动的阴离子通道(回忆节 7-2,血液中 CO_2 的运输在红细胞中被变换成 HCO_3^-)。

红细胞膜骨架决定了红细胞的形状

正常红细胞的双凹面圆盘样形状(图 7-16a),将血红蛋白分子安置在距细胞表面不到 1μm 处,这一形状保证了 O_2 向血红蛋白分子迅速扩散。然而,红细胞的边缘和微凹区在细胞膜上并不占有固定的位置。这能通过如下观察得以证明:通过将红细胞的一小部分表面固定在显微镜载物玻片上,从而锚定红细胞。用等渗缓冲液轻柔的流动诱导红细胞的侧向运动,原来在细胞边缘上的一点,跨越凹面移向细胞的对面边缘。显然,膜在保持其形状的同时,滚动跨过细胞,很像拖拉机的踏步。红细胞膜的这一卓越机械性质是由于存在蛋白质的亚膜网状结构,其功能有如膜骨架。

膜骨架结构赋予红细胞的流动性和柔性具有重要的生理意义。固体粒子浆液的大小和浓度与血液中红细胞相同,其流动性质接近沙子。所以为了使血液顺畅流动,尽量减少红细胞通过直径比它小得多的毛细血管时的挤压,红细胞膜及其膜骨架必须是流体样和易变形的。

血影蛋白(spectrin)所以如此称呼,是因为它是从红细胞空壳细胞里被发现的,约占红细胞膜骨架的 75%。它由两条相似的多肽链组成,即带 1(α 亚单位;280kDa)和带 2(β 亚单位;246kDa),每条多肽链是由 106 个残基的重复肽段所组成,这些重复肽段被预测折叠成三股 α 螺旋的卷曲螺旋(图 10-14)。这些肽大多松散地相互卷曲形成柔性的虫样 αβ 二聚体,长达 1000Å。两个这样的异二聚体,进一步以头对头方式结合形成$(\alpha\beta)_2$四聚体。每个细胞约有 100 000 个血影蛋白四聚体,它们通过带 4.1 和带 5 蛋白在两端结合,交联形成一个位于红细胞质膜下的稠密而又不规则的蛋白质网络(图 10-15)。带 5 是一个球蛋白,形成丝状寡聚体,已被识别为肌动蛋白,在其他细胞,包括肌肉中,是一种普通的细胞骨架成分(节 7-3B)。血影蛋白也和带 2.1 蛋白连接,带 2.1 蛋白被称为**锚蛋白**(ankyrin),是一个 1880 个残基的单体。锚蛋白又与带 3 蛋白结合,该蛋白是阴离子通道蛋白,这种连接使膜骨架锚定在膜上。免疫化学的研究表明,在各种组织里存在类血影蛋白、类锚蛋白和类带 4.1 蛋白的蛋白质。

252

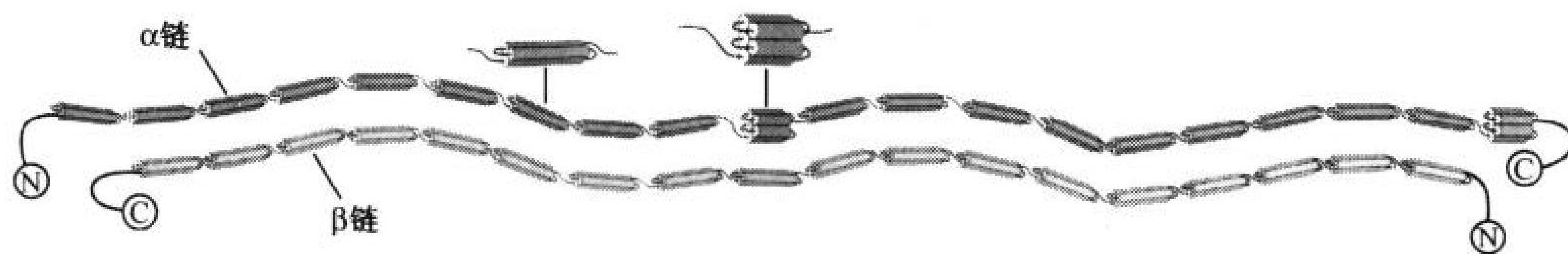


图 10-14 血影蛋白 αβ 二聚体的结构

两个反平行多肽包含多个 106 个残基的重复单位,它们形成三股螺旋束,通过非螺旋肽段柔性连接,两个这样的异二聚体头对头相连形成一个$(\alpha\beta)_2$四聚体。[引自 speicher, D.W. and Marchesi, V., Nature 311, 177(1984)]

红细胞的细胞骨架是可变形的,这就给细胞提供了需要挤过毛细血管时的柔性。患有遗传球形红细胞症的个体,其球形红细胞比较脆弱和不太柔韧。这些个体患有**溶血性贫血**(hereditary spherocytosis),因为脾脏是一个错综复杂的器官,它具有狭窄的通道,正常地滤除年老的红细胞(失去柔性,趋向 120 天生命期的尽头),除去早熟的球形红细胞。溶血性贫血通过外科手术去掉脾脏可以减轻,但球形红细胞的原发性缺陷是降低了血影蛋白的合成,产生对带 4.1 蛋白低亲和性的不正常血影蛋白,或是缺乏带 4.1 蛋白。

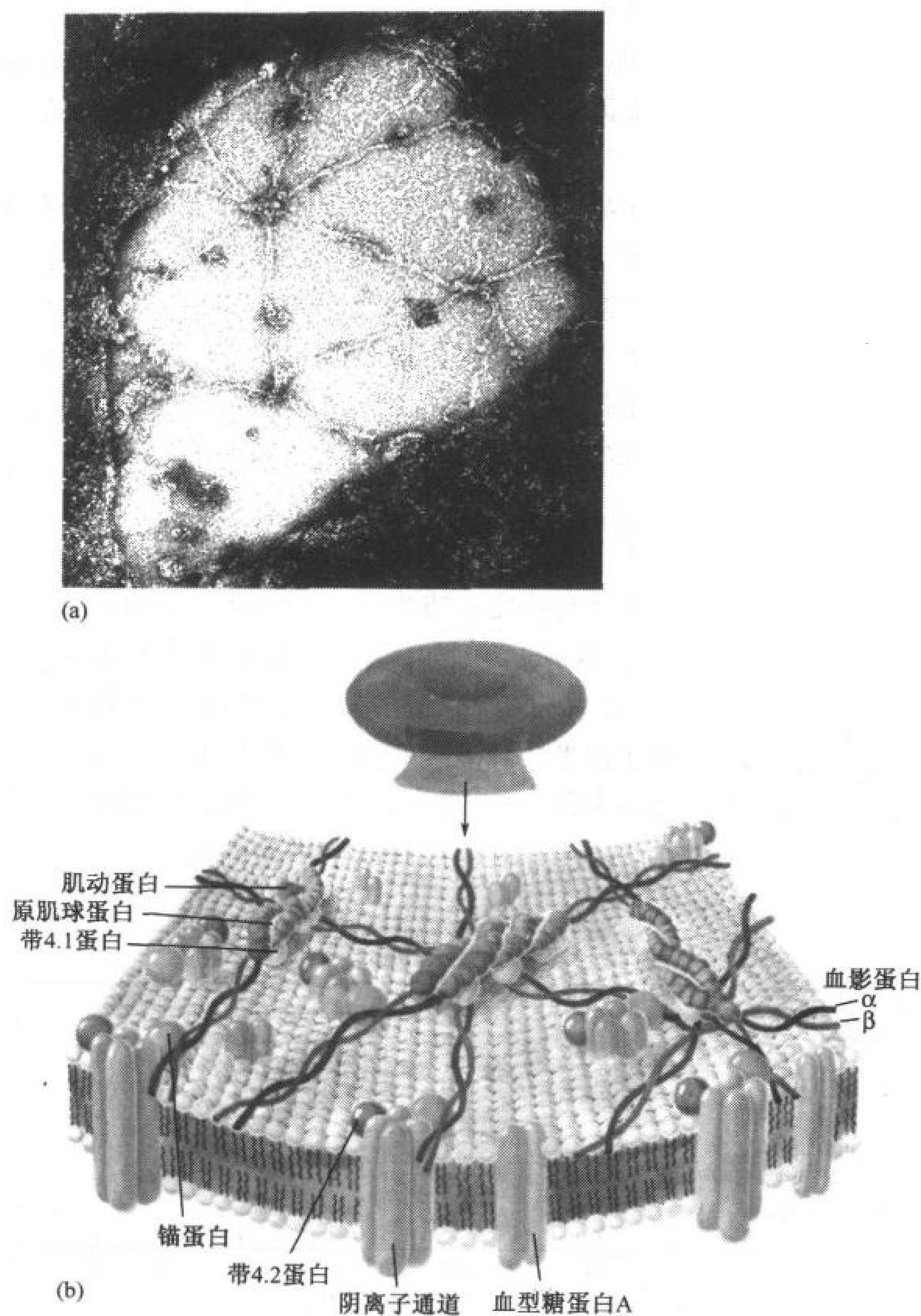


图 10-15 人红细胞膜骨架

(a) 红细胞膜骨架的显微电镜照片，已被伸展至天然膜面积的 9～10 倍，伸展使之可能得到清晰的膜骨架图像，膜骨架在天然状态下是如此密集地包装和不规则折曲，以至难以挑出单个分子并弄清楚它们是如何相互连接的。注意：占支配地位的六边形网状结构，是由含有肌动蛋白和带 4.1 蛋白的结合物交联血影蛋白四聚体所组成。(引自 Daniel Branton, Harvard University)(b) 红细胞膜骨架的模型，所谓的结合复合物在此图中被放大，它包含肌动蛋白、原肌球蛋白(节 7-3B)、带 4.1 蛋白和其他蛋白质。[引自 Goodman, S. R., Krebs, K.E., Whitfield, C.F., Riederer, B.M., and Zagen, I.S., CRC Crit. Rev. Biochem. 23, 196 (1988)]

细胞质对膜的异质性有作用

253

正如流动镶嵌模型设想的那样，生物膜是由脂和蛋白质的异质斑片镶嵌组成(例如紫膜，节 10-1A)，膜成分的不均匀分布部分地受细胞骨架影响。这点很像有些膜内在蛋白牢固地结合在细胞骨架的元件上，或者捕陷于这类“围栏”限定的空间之内。其他膜蛋白可以挤过细胞骨架成

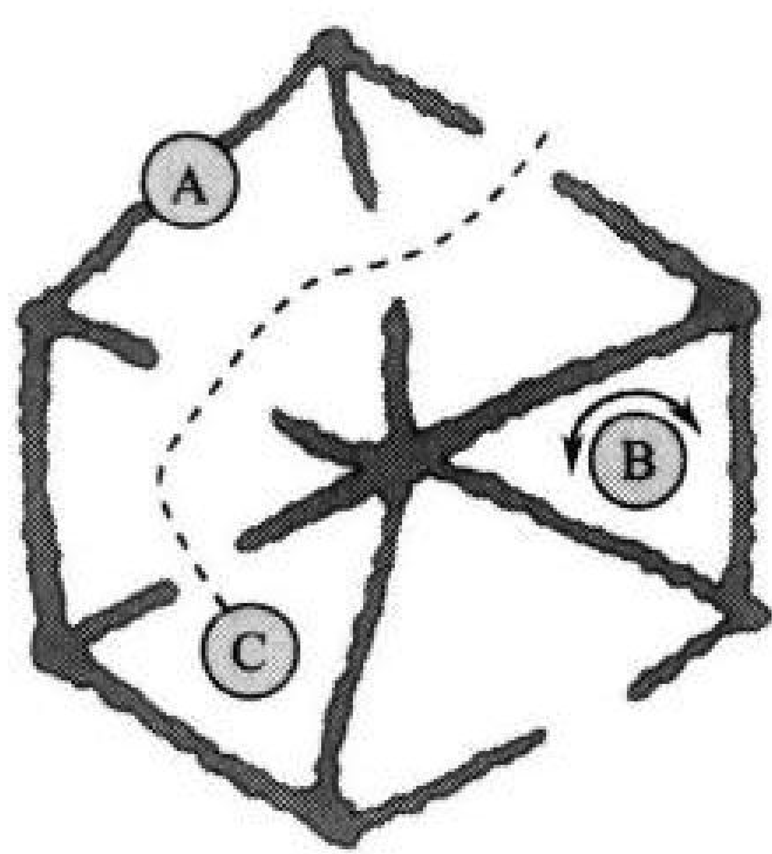


图 10-16　合理说明膜蛋白的各种流动性模型

蛋白质 A 和位于其下的细胞骨架紧密地相互作用，是固定的。蛋白质 B，在细胞骨架"围栏"限定的范围内，可自由旋转。蛋白质 C，通过细胞骨架里的"门"进行扩散。有些膜蛋白的扩散不受细胞骨架的影响。[引自 Edidin, M., TRENDS Cell Biol. 2, 378 (1992)]

分之间的间隙或"门"，而另外一些蛋白质仍可完全不与细胞骨架相互作用，能自由扩散(图 10-16)。当细胞骨架部分受损，其结果是蛋白更自由扩散，这一发现为**"门栏"模型**(gates and fences model)提供了证据。

被细胞骨架成分限制的蛋白质可形成独特的膜结构域，即使少数蛋白质的聚集，也能形成微结构域，其性质不同于周围的区域。蛋白质和邻近脂的头或尾基团之间的专一性相互作用，导致膜脂成分的异质性。许多膜蛋白被认为被特定的脂环所包围，被称为**环形脂质**(annular lipid)。有些膜结构域似乎主要由特定的脂质聚集而形成，例如富含鞘糖脂、鞘磷脂和胆固醇，但不存在糖磷脂的区域。

C. 脂的不对称性

膜成分有特定的方向性，所以脂双层的两片小叶在组成和功能上都不是等同的。例如，*膜糖蛋白和膜糖脂总是将其糖部分面向细胞外表，用磷脂酶能确定在膜的内外小叶间分布着某些脂*(节 9-1C)。由于磷脂酶不能穿过膜，因此只有在完整细胞外表面上的磷脂才可被磷脂酶水解，这一研究揭示脂在生物膜中是不对称分布的(图 10-17)。这种不对称性是如何产生的呢？

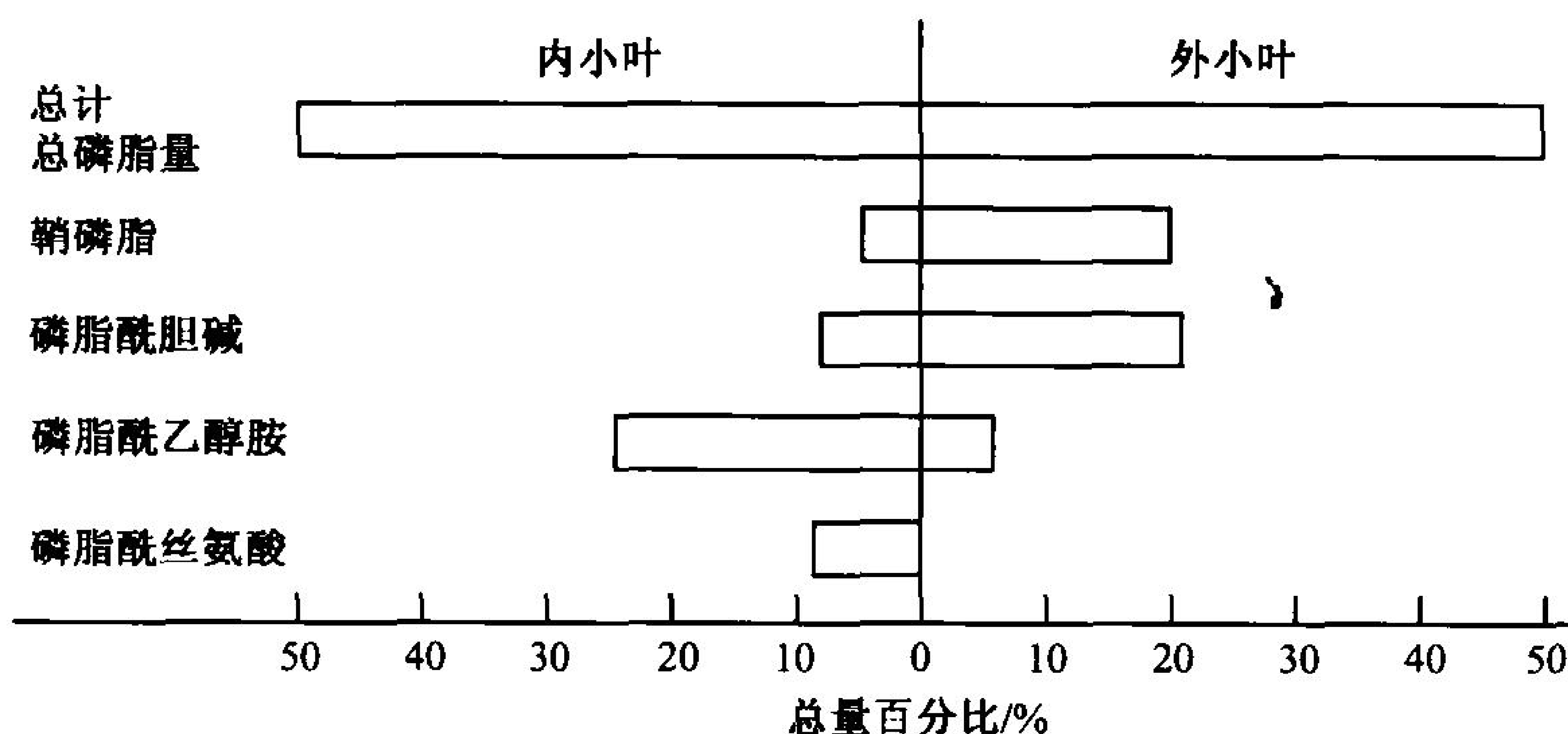


图 10-17　膜磷脂在人红细胞膜中的不对称分布

磷脂量以 mol% 表示。[引自 Rothman, J.E and denard, J., Science 194, 1744(1977)]

254

真核生物膜脂的生物合成酶大多数是**内质网**(endoplasmic reticulum, ER)(相互连接的膜小泡，占据了大部分胞质，图 1-8)的膜内在蛋白。在原核生物中，脂在细胞质膜中合成，因此膜脂是在现场被加工的，Eugene Kennedy 和 James Rothman 应用选择性标记在细菌上证实了这一点。他们给生长中的细菌 1min 的$^{32}PO_4^{3-}$ 脉冲，目的是将放射性标记在刚合成的磷脂的磷酰基团。**三硝基苯磺酸**(trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)，一种能与磷脂酰乙醇胺(PE)(图 10-18)结合但不能透过膜的试剂，立即加入到细胞悬浮液中，分析由此形成的双重标记膜，结果表明 TNBS 标记的 PE 没有被标上放射性。这一观察表明，*最新生成的 PE 是在膜的细胞质面合成的*(图 10-19)。

然而，在$^{32}PO_4^{3-}$ 脉冲和 TNBS 加入之间如果允许有 3min 时间的间隔，约有半数^{32}P 标记的

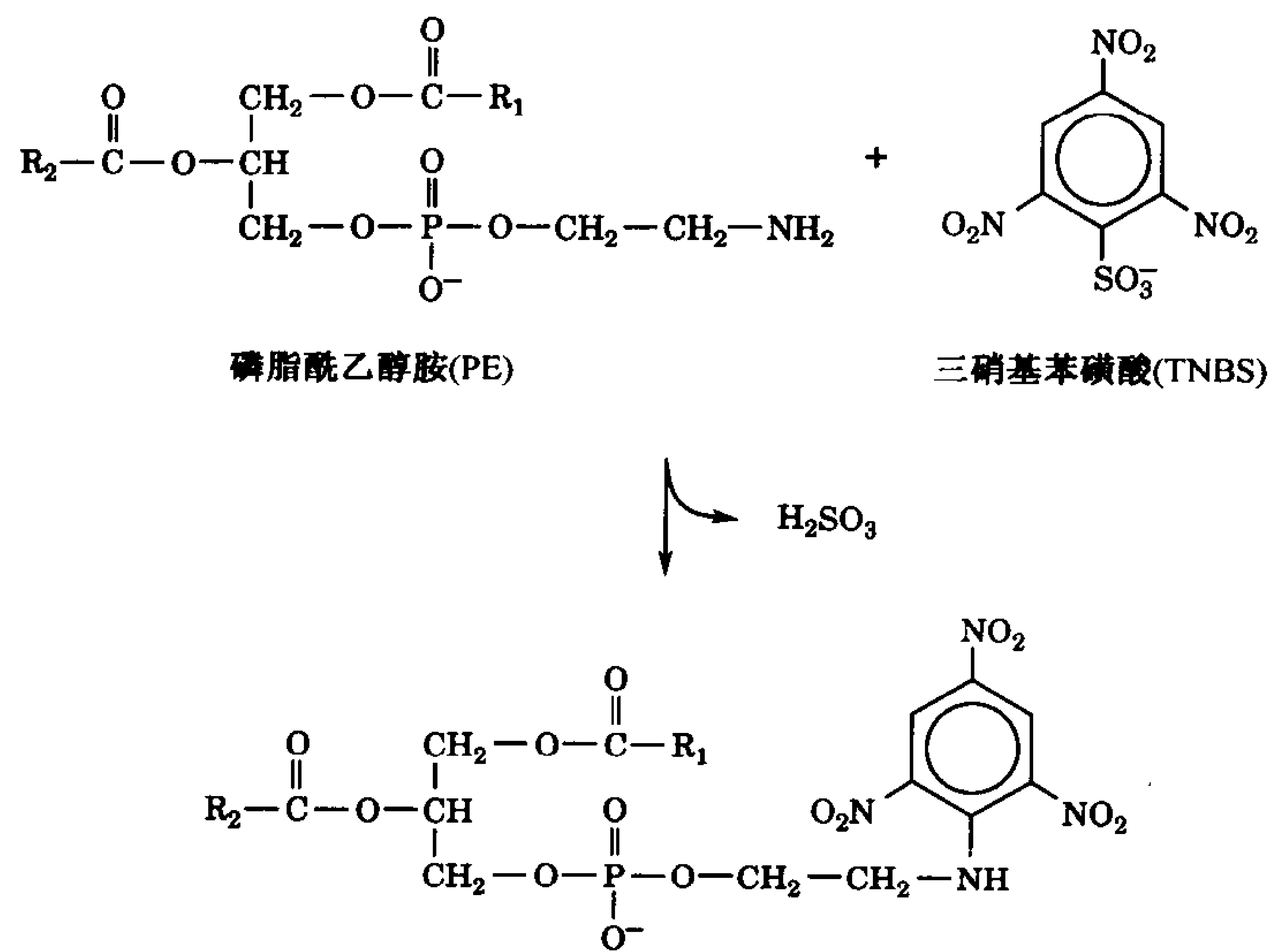


图 10-18　TNBS 与磷脂酰乙醇胺的反应

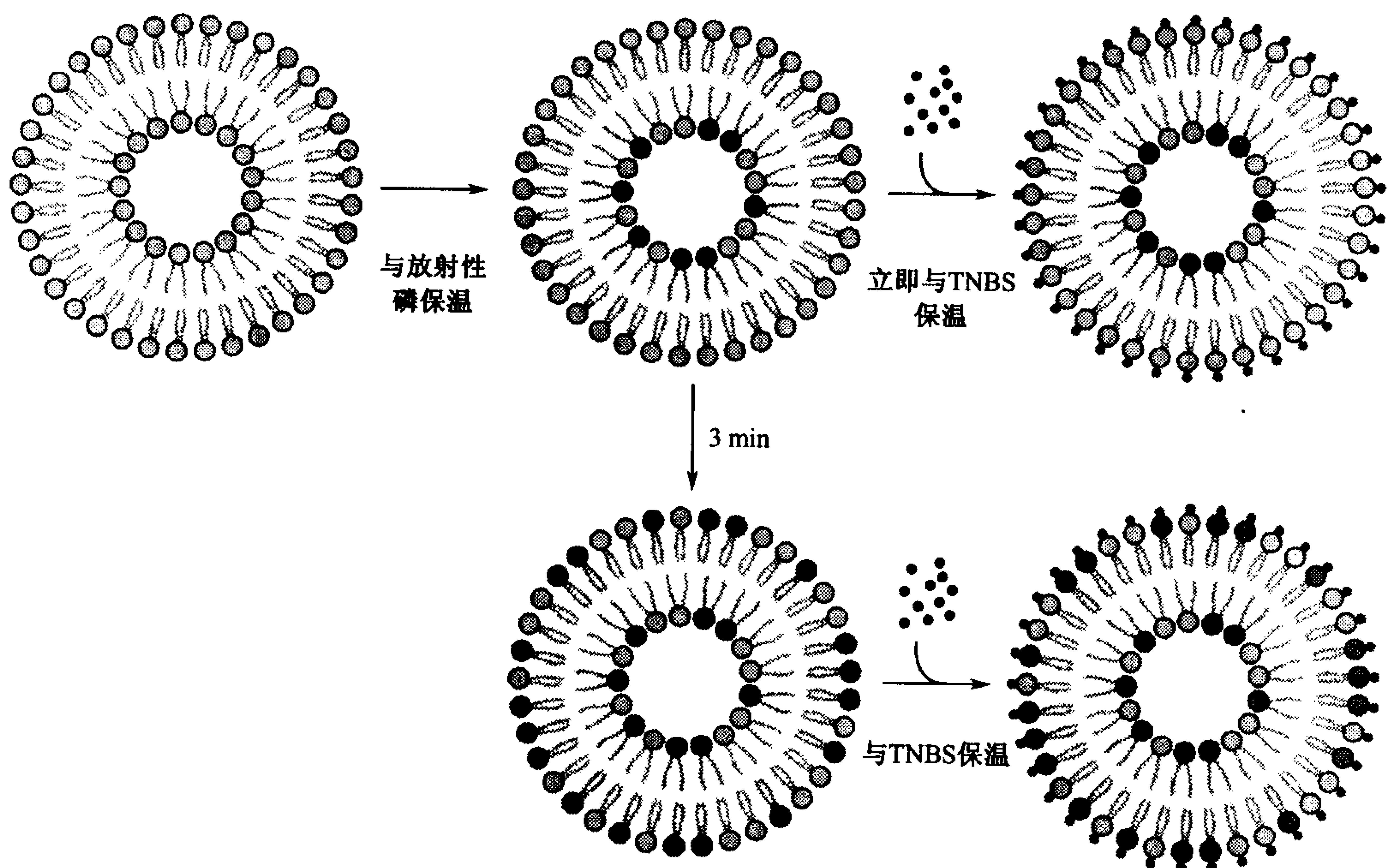


图 10-19　细菌膜上脂合成的定位

新合成的 PE 经 $^{32}PO_4^{3-}$ 1min 脉冲标记(橙色头部基团)，在细胞表面的 PE 独立用不能透过膜的 TNBS 试剂处理予以标记。当 ^{32}P 脉冲后立即进行 TNBS 标记，被 ^{32}P 标记的 PE 都不被 TNBS 所标记(上右图)，这表明 PE 是在膜的细胞质一面合成的。然而，在这两种标记过程之间，哪怕甚至只有数分钟的耽搁，许多在膜的外露面被 TNBS 标记的 PE 也被 ^{32}P 所标记(下图)。

PE 也被 TNBS 标记(图 10-19)。这一观察表明 PE 在细菌膜中的翻转速度要比在仅由磷脂构成的双分子层中高十万倍(双分子层半时翻转速率为数天)。

磷脂在膜的一侧合成,如何迅速地到达它的另一侧?磷脂翻转有两种方法似乎很有利。

1) 膜含有**翻转酶**(flipase)蛋白,催化特定的磷脂翻转。这些翻转酶蛋白倾向穿过双分子层,均衡分布在它们相应的磷脂中,即磷脂从双分子层高浓度一侧转运到其相反的一侧。这一过程,我们将在节 10-4B 中讨论,是一种**易化扩散**(facilitated diffusion)的形式。
2) 膜含有**磷脂转位酶**(phospholipid translocase)蛋白,该酶转运特定的磷脂,穿越双分子层,这一过程由 ATP 水解驱动。这些蛋白质能将某些磷脂从双分子层的低浓度一侧转运到相反的一侧,因此建立了一种磷脂的不均衡分布。这一过程,我们将在节 10-4C 中讨论,是一种**主动运输**(active transport)的形式。

因此,观察到的磷脂跨膜分布(如图 10-17)是由于合成磷脂的酶的膜定位产生的,这些酶合成磷脂,并抵消 ATP 依赖性磷脂移位酶产生的磷脂不对称分布和翻转酶产生的磷脂均衡分布的倾向。脂转运系统的重要性可由这一观察来说明,存在于许多细胞外表的磷脂酰丝氨酸诱异血液凝固(这是组织损伤的一个特征),对红细胞来说标志着该细胞要从循环中被清除。

所有细胞都是通过现存膜的扩展产生新膜。在真核细胞中,内质网向着细胞质的一面合成的脂,通过从内质网萌发的小泡被转运到细胞的其他部分,并和另外的细胞膜融合。这些小泡也具有膜蛋白。

D. 分泌途径

膜蛋白和所有的蛋白质一样,在核糖体上按信使 RNA 模板的指导而合成(翻译将在第 26 章讨论)。多肽通过逐步增加氨基酸残基从 N 末端向 C 末端增长。核糖体在胞液中可以是游离的,或者结合在内质网上,形成**粗糙内质网**(rough endoplasmic reticulum, RER)(之所以这样命名是因为内质网结合核糖体后产生了多疙瘩的外观,见图 1-8)。*游离的核糖体主要合成可溶性线粒体蛋白,而膜结合核糖体则制造跨膜蛋白和那些注定要分泌的蛋白质,分泌蛋白在内质网中合成并掺入***溶酶体**(lysosome)*中*(图 1-8;膜状小泡含有水解酶库,降解并再生细胞成分)。这些后面的蛋白质最初都出现在内质网中。

信号假说

信号假说(signal hypothesis)是由 Günter Blobel、César Milstein 和 David Sabatin 提出,部分解释了大且相对极性的多肽被合成时是如何穿过粗糙内质网的(图 10-20)。

1) *所有分泌的内质网和溶酶体蛋白质以及许多跨膜蛋白被合成时,N 末端有 13~36 个残基的***信号肽**(signal peptide)。这些信号肽含有 7~13 个残基构成的疏水核,相对亲水的残基位于疏水核的两侧(图 10-21)。另外,信号肽几乎没有顺序同源性。
2) 约有 80 个残基连接在一起后,信号肽最先突出核糖体表面。此时,**信号识别粒子**(signal recognition particle, SRP),一个 325kDa 由 6 个不同的多肽和 300 核苷酸的 RNA 分子组成的复合物,与核糖体结合(这个 RNA 通过与核糖体 RNA 的结合,可促使 SRP 和核糖体结合),这就阻止了多肽进一步生长。
3) SRP-核糖体复合体扩散到 RER 表面,在此处和一个跨膜蛋白,即 **SRP 受体**(SRP receptor)[停靠蛋白质(docking protein)]结合,和 SRP 受体的结合刺激核糖体再开始多肽的

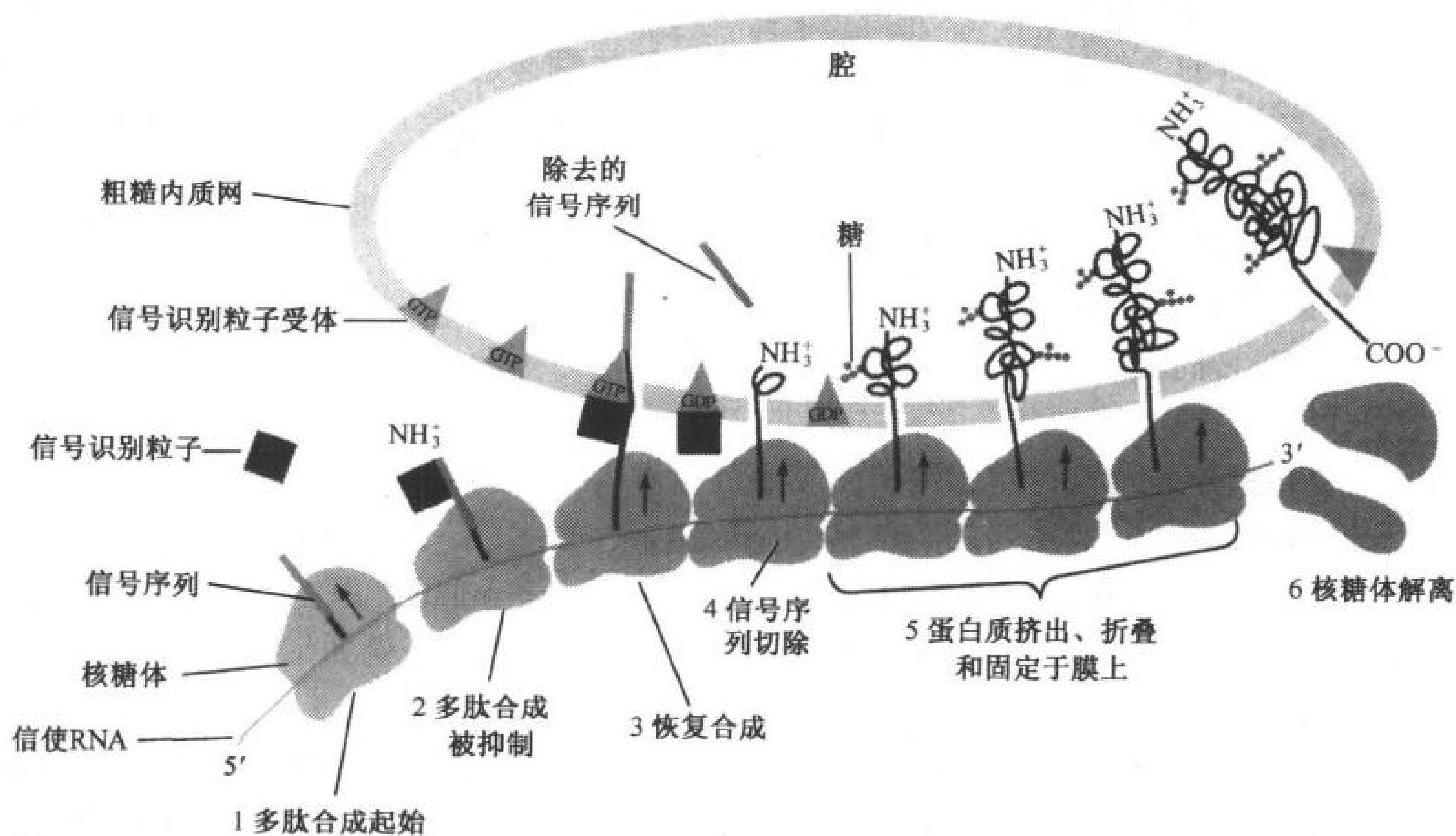


图 10-20 功能的秘诀:信号假说

示意图显示膜内在蛋白的核糖体合成、膜插入和早期糖基化作用。预定分泌的蛋白质完全进入内质网腔。为清晰起见,相对于其他细胞成分,核糖体以它的实际大小的约 1/50 表示。

		信号肽酶裂介位点
牛生长激素	MMAAGPRTSLLLAFALLCLPWTQVVG	AFP
牛前白蛋白	MKWVTFISLLLLFSSAYS	RGV
人胰岛素原	MALWMRLLPLLALLALWGPDPAAA	FVN
人γ-干扰素	MKYTSYILAFQLCIYLGSLG	CYC
人α-纤维蛋白原	MFSMRIVCLVLSVVGTAWT	ADS
人IgG重链	MEFGLSWLFLVAILKGVQC	EVQ
鼠淀粉酶	MKFVLLLSLIGFCWA	QYD
鼠α-胎蛋白	MKWITPASLILLLLHFAASK	ALH
鸡溶菌酶	MRSLLILVLCFLPLAALG	KVF
玉米支配蛋白 22.1	MATKILALLALLALLVSATNA	FII

图 10-21 若干真核生物分泌性前蛋白的 N 端序列

大多数信号肽的疏水核(棕色)在其前面有碱性残基(蓝色),氨基酸残基单字母编码见表 4-1。

[引自 Watson, M.E.E., Nucleic Acid Res. 12, 5147-5156(1984)]

合成,并促进成长中多肽的 N 端进入 RER 腔。多肽经跨膜蛋白通道穿过膜,然后,信号肽、SRP 和 SRP 受体分离。在此过程中,**鸟苷三磷磷**(guanosine triphosphate, GTP)水解为**鸟苷二磷酸**(guanosine diphosphate, GDP)和无机磷酸(P_i)。大多数核糖体过程,就像我们将要在节 26-4 中介绍的,是由 GTP 水解驱动的。

4) 信号肽进入 RER 腔后很快就被和膜结合的**信号肽酶**(signal peptidase)从生长中的多肽上专一性地切除。连接着信号肽的多肽因此被称为**前蛋白质**(preprotein)。

5) 新生肽链开始折叠成它的天然构象,这一过程是通过和分子伴侣蛋白 Hsp70(节 6-4C)相互作用进行的。然后,RER 腔中的酶对多肽开始**翻译后修饰**(post-translational modification),包括接上核心寡糖,生成糖蛋白(节 8-3C),并由蛋白质二硫键异构酶催化生成二硫键(节 6-4C)。

6) 当多肽合成完成时,核糖体从 ER 上解离下来。分泌性蛋白——ER 和溶酶体蛋白通过 RER 膜完全进入 RER 腔。反之,跨膜蛋白含有约 20 个疏水性残基的"膜锚",或"终止转移"顺序,它们阻止成长中的多肽链通过膜。因此,跨膜蛋白仍镶嵌在 ER 膜里,而它们的 C 端则在细胞质一侧。

信号假说也适用于细菌。跨越细菌质膜的蛋白质具有类似真核生物的 N 端信号肽,它们是由膜结合的核糖体合成。对革兰氏阴性菌,用重组 DNA 技术(节 3-5)将信号肽添加到正常细胞质蛋白,导致杂合蛋白被转运到**周质空间**(periplasmic compartment)(原生质膜和细胞壁之间的空间,图 8-14b)。然而,信号假说不能解释所有膜内在蛋白的定位,例如细菌视紫红质(图 10-4)具有多个跨膜区段。

258

在真核生物中,胞质中合成的蛋白质要到达线粒体**基质**(matrix)(线粒体的内间隔)必须横跨两层膜(某些叶绿体蛋白必须穿越三层叶绿体膜),有些线粒体基质蛋白质的转位需要 Hsp70 这样的分子伴侣(节 6-4C)和线粒体外膜上的一种重要受体。可是,另外的线粒体蛋白质并不需要这些介导体,它们通过其他机制到达最终目的地。

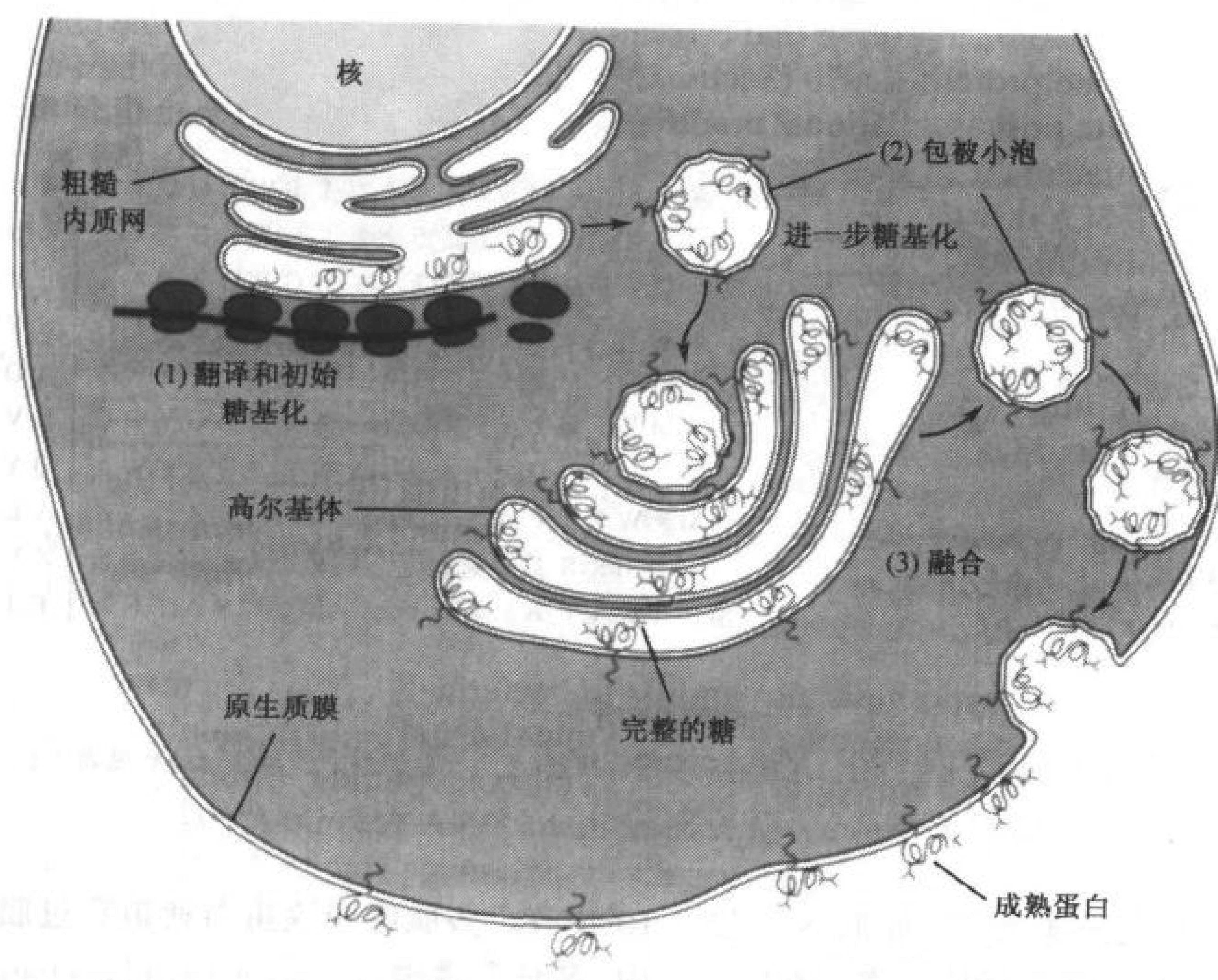


图 10-22 *功能的秘诀*:内源性膜蛋白的翻译后加工

(1) 当蛋白质被核糖体合成,糖基化作用就在 ER 腔内开始。(2) 核糖体上的合成完成后,包含蛋白质的包被膜小泡芽出 ER,移向高尔基体,在这里完成蛋白质的加工。(3) 包含成熟蛋白质的膜小泡芽出高尔基体,和该蛋白质的靶向膜融合,此处是原生质膜。

蛋白质靶向到达其特定目的地

部分加工的跨膜蛋白、分泌蛋白、溶酶体蛋白在 RER 上合成后，有时出现在**高尔基体**(Golgi apparatus)(图 1-8)中，高尔基体是一种细胞器，由展开的功能性独特的膜袋堆积而成。镶嵌在膜中的或者游离于腔内的蛋白质，为了进一步翻译后加工，大多为糖基化，从一个高尔基体移向另一个高尔基体(图 10-22)。在最后的高尔基体小室中，加工后的蛋白质被分类，并被送往它们在细胞中的最终目的地。

蛋白质从高尔基体转送到它们最终目的地的运载体被称为**被膜小泡**(coated vesicle)。这是因为这些膜性小泡的外(胞液)表面被**网格蛋白**(clathrin)形成的多面体框架所围住(图 10-23)，它起到柔性支架作用，使膜小泡从原来的膜出芽。但是，在 ER 和高尔基体之间运送蛋白的膜小泡并不被网格蛋白包被，而是代之以 **COPI** 或 **COPII**(COP 代表包被蛋白)。被 COPI 和 COPII 包被的膜小泡，在电镜下呈现绒毛状外观(图 10-24)，而不是包被网格蛋白膜小泡的多面壳外形(图 10-23)。

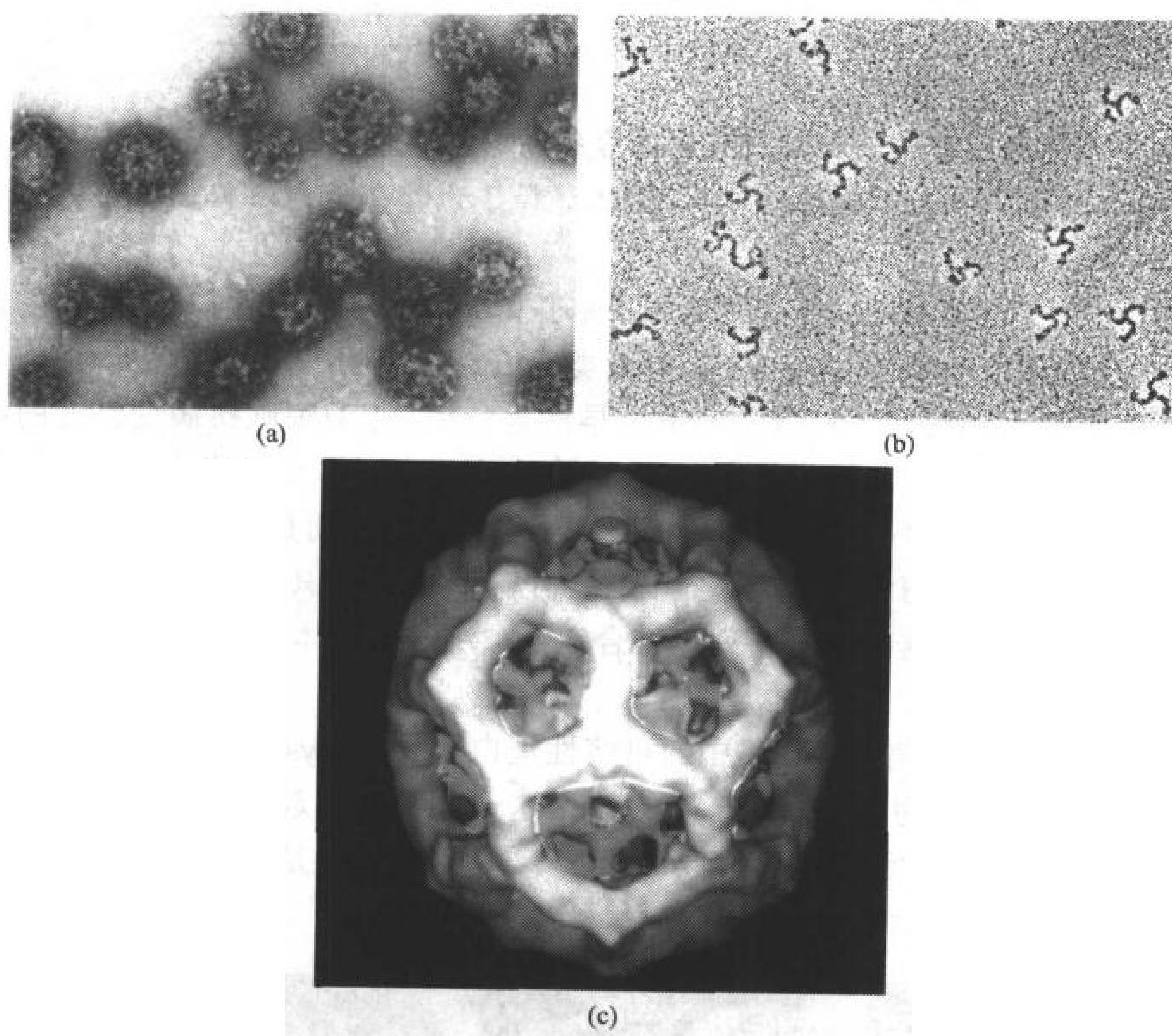


图 10-23　网格蛋白包被的小泡

网格蛋白的多面体框架，和它结合的蛋白质形成环绕膜袋的笼子。(a) 包被网格蛋白小泡的电子显微镜照片。(引自 Barbara Pearse, Medical Research Council, Cambridge U.K)(b) 三脚蛋白体(trikelions)的电子显微镜照片，三脚蛋白复合物集成网格蛋白笼，三脚蛋白体脚的不同方向说明它们的柔性。(引自 Daniel Branton, Harvard University)(c) 来自网格蛋白壳的电子显微镜照片的三维图，多面体网格蛋白的壳以橙色表示，网格蛋白末端结构域以绿色表示，附属蛋白的内壳为蓝色。多面体的每个顶点是三脚蛋白体的中心，它的边长为约 150Å，是由毗邻三脚蛋白质的脚重叠形成。这个框架由 12 个五边形和可变数目的六边形所构成，是在多面体笼里围住类球形体的最节省方式。(引自 Barbara Pearse, Medical Research Council, Cambridge, U.K.)

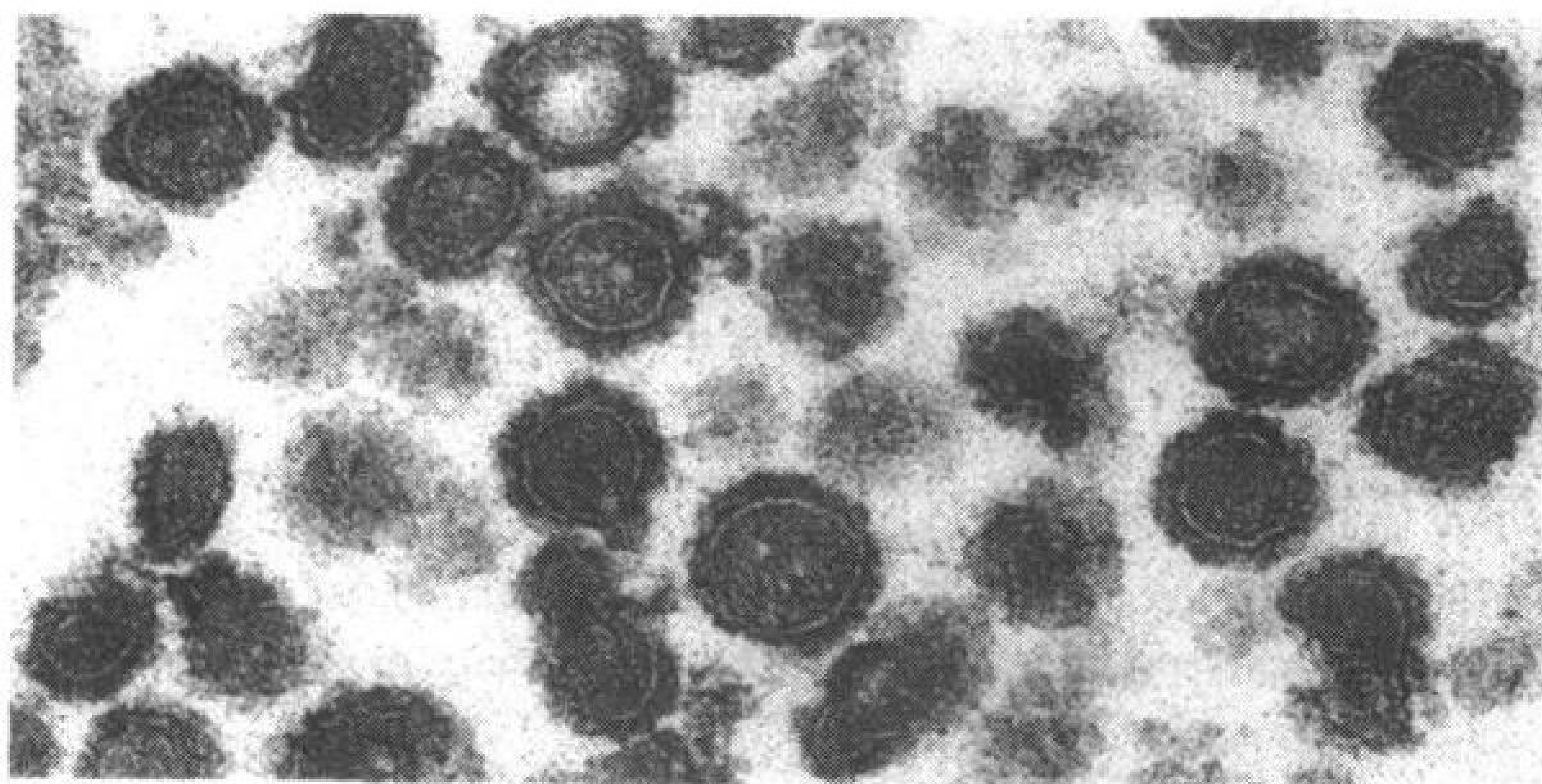


图 10-24 包被 COP 小泡的电子显微镜照片
注意：没有网格蛋白包被的小泡，其表面是如何缺乏多面体性质。
（引自 Lelio Orci, University of Geneva, Switzerland）

260

总之，一个小泡的出芽以及和其他膜的融合维持它的跨膜蛋白质的定向。因此，内质网腔和高尔基体腔在拓扑学上相当于细胞的外表，这就解释了为什么膜内在糖蛋白的糖分子只存在于原生质膜的外表面。

在内质网上的蛋白是怎样被挑选转运到高尔基体，又怎样从那里再转运到它们各自的膜目的地？被称为**I型细胞疾病**(I-cell disease)的人类遗传缺陷，提供了这个过程本质的一个线索，该疾病的纯合子以进行性智力迟缓、骨骼畸形和早逝为特征。I型细胞疾病受害者的结缔组织中的溶酶体含有大量糖胺聚糖和糖脂包含体，这是缺乏某些溶酶体水解酶的结果。这些酶在内质网上按它们正确的氨基酸序列合成，但是并未派送到溶酶体中，而是分泌到细胞外介质中。这种错误导向是由于这些水解酶的糖组成部分中缺乏甘露糖-6-磷酸识别标记所致，其原因是缺乏甘露糖磷酸化需要的酶。甘露糖-6-磷酸残基结合在包被小泡的受体上，并从高尔基体将溶酶体水解酶转运到溶酶体中。

在哺乳动物中，大多数存在于 ER 中的可溶性蛋白质具有 Lys-Asp-Glu-Leu 的 C 端序列（应用单字母氨基酸符号表示为 KDEL，表 4-1），改变这一序列会引起蛋白质被分泌。KDEL 蛋白质，与分泌性蛋白和溶酶体蛋白一样，容易经由膜小泡而离开，但是 KDEL 蛋白质又被立即从以后的间隔重新获得，并返回到 ER 中。

3. 脂蛋白和受体介导的内吞作用

脂质，诸如磷脂、三脂酰甘油和胆固醇很难溶于水溶液。因此，它们和蛋白质复合，通过血液循环运输，经受体介导的过程被细胞摄取。

A. 脂蛋白结构

脂蛋白(lipoprotein)是球状胶粒，由三脂酰甘油和胆固醇酯的非极性核以及围绕核的由蛋白质、磷脂和胆固醇所形成的两性包被组成。脂蛋白有 5 类（表 10-1）：

表 10-1　人血浆中主要脂蛋白种类的特性

	乳糜	极低密度脂蛋白 VLDL	中间密度脂蛋白 IDL	低密度脂蛋白 LDL	高密度脂蛋白 HDL
密度/($g\cdot cm^{-3}$)	<0.95	<1.006	1.006～1.019	1.019～1.063	1.063～1.210
粒径/Å	750～12 000	300～800	250～350	180～250	50～120
粒子质量/kDa	400 000	10 000～80 000	5000～10 000	2300	175～360
蛋白[a]/%	1.5～2.5	5～10	15～20	20～25	40～55
磷脂[a]/%	7～9	15～20	22	15～20	20～35
游离胆固醇[a]/%	1～3	5～10	8	7～10	3～4
三脂酰甘油[b]	84～89	50～65	22	7～10	3～5
胆固醇酯[b]	3～5	10～15	30	35～40	12
主要载脂蛋白	A-I, A-II, B-48, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-I, C-II, C-III, E	B-100, C-III, E	B-100	A-I, A-II, C-I, C-II, C-III, D, E

[a] 表面成分；　[b] 核脂

1) **乳糜微粒**(chylomicron)，将外源性(外部提供，此处指饮食)三脂酰甘油和胆固醇从肠道转运到组织。

2～4) **极低密度脂蛋白**(very low density lipoprotein, VLDL)、**中间密度脂蛋白**(intermediate density lipoprotein, IDL)和**低密度脂蛋白**(low density lipoprotein, LDL)是一组相关的粒子，将内源性(内部制造的)三脂酰甘油和胆固醇从肝脏转运到组织。

5) **高密度脂蛋白**(high density lipoprotein, HDL)，将内源性胆固醇从组织转运到肝脏。

261

各种脂蛋白的生理作用和其代谢过程将在节 19-1 中详细介绍。

每种脂蛋白含有恰好够量的蛋白质、磷脂和胆固醇，在粒子的表面形成厚约 20Å 的单层结构(图 10-25)。脂蛋白密度随粒子直径的减小而增大，因为脂蛋白外层的密度高于其内核密度。所以，HDL 在脂蛋白中密度最高，体积也最小。

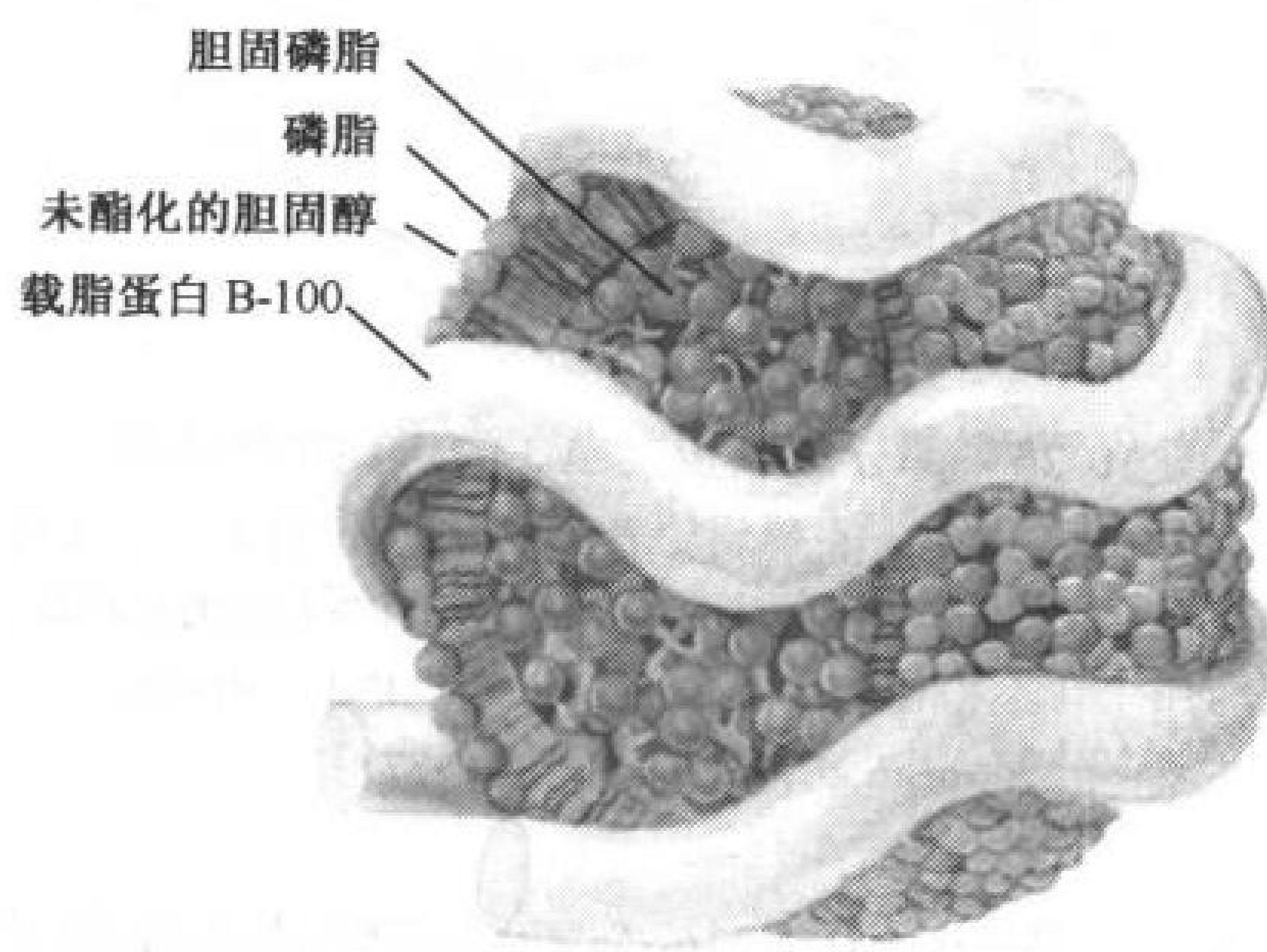


图 10-25　血流中胆固醇的主要载体 LDL 示意图

球状粒子由 1500 个胆固醇酯分子所组成，外覆盖一层由约 800 个磷脂分子、约 500 个胆固醇分子和单个 550kDa 的载脂蛋白 B-100 分子组成的两性层。

覆盖脂蛋白表面的载脂蛋白具有两性螺旋

脂蛋白的蛋白质成分称为**载脂蛋白**(apolipoprotein)或**脂蛋白**(apoprotein)。至少有 9 种载脂蛋白按不同量分布在人的脂蛋白(表 10-1)中。大多数载脂蛋白是水溶性的,并和脂蛋白微弱结合。这些载脂蛋白也具有很高的螺旋含量,当它们掺入脂蛋白时,螺旋含量还会增加。显然,螺旋为脂环境所稳定,因为在脂蛋白的无水内部,螺旋充分满足了主链的氢键势能。

262

载脂蛋白 A-I(apolipoprotein A-I),存在于乳糜微粒和 HDL 中,是一个由 243 个氨基酸残基构成的 29kDa 多肽。它主要由 6 个串行排列的、具有相似序列的 22 个残基片段组成,每个片段后随 β 转角,具有形成 α 螺旋的高度倾向(节 6-1D)。*这些假定的螺旋和存在于大多数其他载脂蛋白中的类似螺旋,它们的疏水残基和亲水残基在螺旋圆柱体的相对侧*(图 10-26)。此外,这个极性螺旋面具有偶极特性,因为它的负电性残基凸出螺旋面中央,而它的正电性残基则处于螺旋的边缘。这启示*飘浮在磷脂表面的载脂蛋白 α 螺旋很像水上的圆木*。磷脂按它们的荷电基团排列,这些带电荷的基团和螺旋面上的带相反电荷的基团结合;并且按它们的脂肪酸残基的起先几个亚甲基排列,和螺旋的非极性面疏水结合。

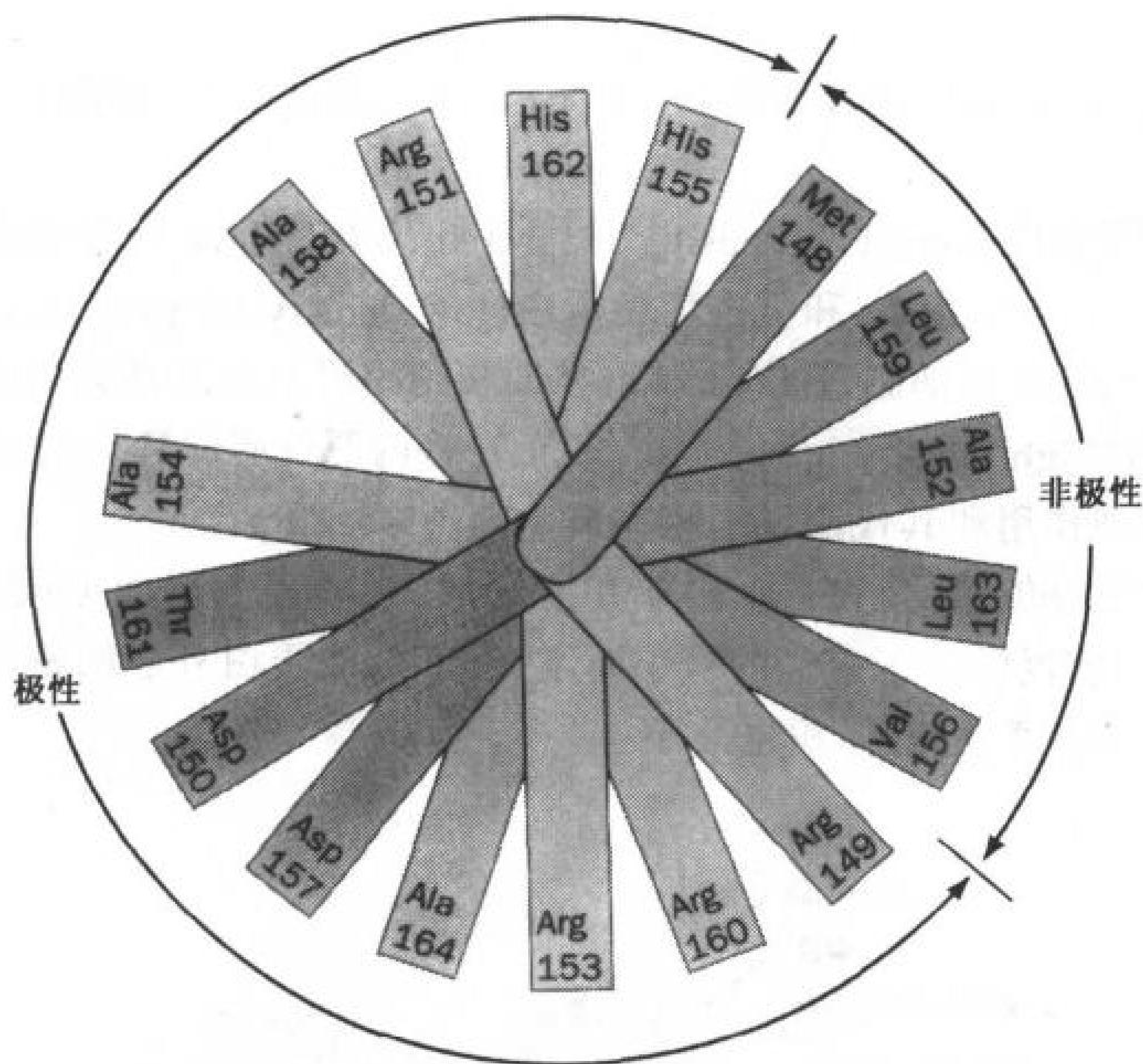


图 10-26 部分载脂蛋白 A-I 的螺旋轮投影图

由残基 148～164 构成的假设性两性 α 螺旋。在螺旋轮表示中,侧链位置在一个平面上被投影到螺旋轴。注意:极性和非极性残基被隔离在螺旋的不同侧面,碱性残基隔离在极性表面的外边缘,酸性残基在中央。其他的载脂蛋白有相似的极性分布。[引自 Kaiser E. T., in Oxender, D.L. and Fox, C.F. (Eds), Protein Engi-neering. P.194, Liss (1987)]

载脂蛋白 B-100(apoB-100),是一个由 4536 个氨基酸残基构成的单体(已知最大单体蛋白之一),和膜内在蛋白的疏水性接近。apoB-100 相对只含少数两性螺旋。所以,与其他疏水性较低的血浆载脂蛋白相反,apoB-100 是不溶于水的。每个 LDL 粒子仅含一分子 apoB-100,其免疫电镜显示它具有一种至少覆盖一半粒子表面的伸展形式(图 10-25)。

B. 受体介导的 LDL 内吞作用

如我们所知，胆固醇是动物细胞膜的一种主要成分。细胞能外源性地获得胆固醇，如果外源性资源不充足，则可内部合成(节 19-7A)。Michael Brown 和 Joseph Goldstein 已经证明，细胞获得外源性胆固醇主要通过 LDL 受体介导的内吞作用(吞食)，这一过程的发生如下(图 10-27)：LDL 粒子被 **LDL 受体**隔离，LDL 受体是专一性结合 apoB-100 的细胞表面跨膜糖蛋白。LDL 受体聚集在细胞表面的**包被凹陷**(coated pit)中，以此积聚细胞表面的受体，这些受体注定被内吞，并排除其他细胞表面蛋白；包被凹陷以网格蛋白为背衬，从原生质膜凹入，形成包被小泡(图 10-28)，然后小泡脱去网格蛋白包被，和内部 pH 为 5.0 左右的**核内体**(endosome)融合，在这些条件下 LDL 和它的受体分离；受体再循环回到细胞表面，而包含着 LDL 的核内体与溶酶体融合；在溶酶体中 LDL 的 apoB-100 迅速被降解成它的组成成分氨基酸，胆固醇酯则被水解为胆固醇和脂肪酸。

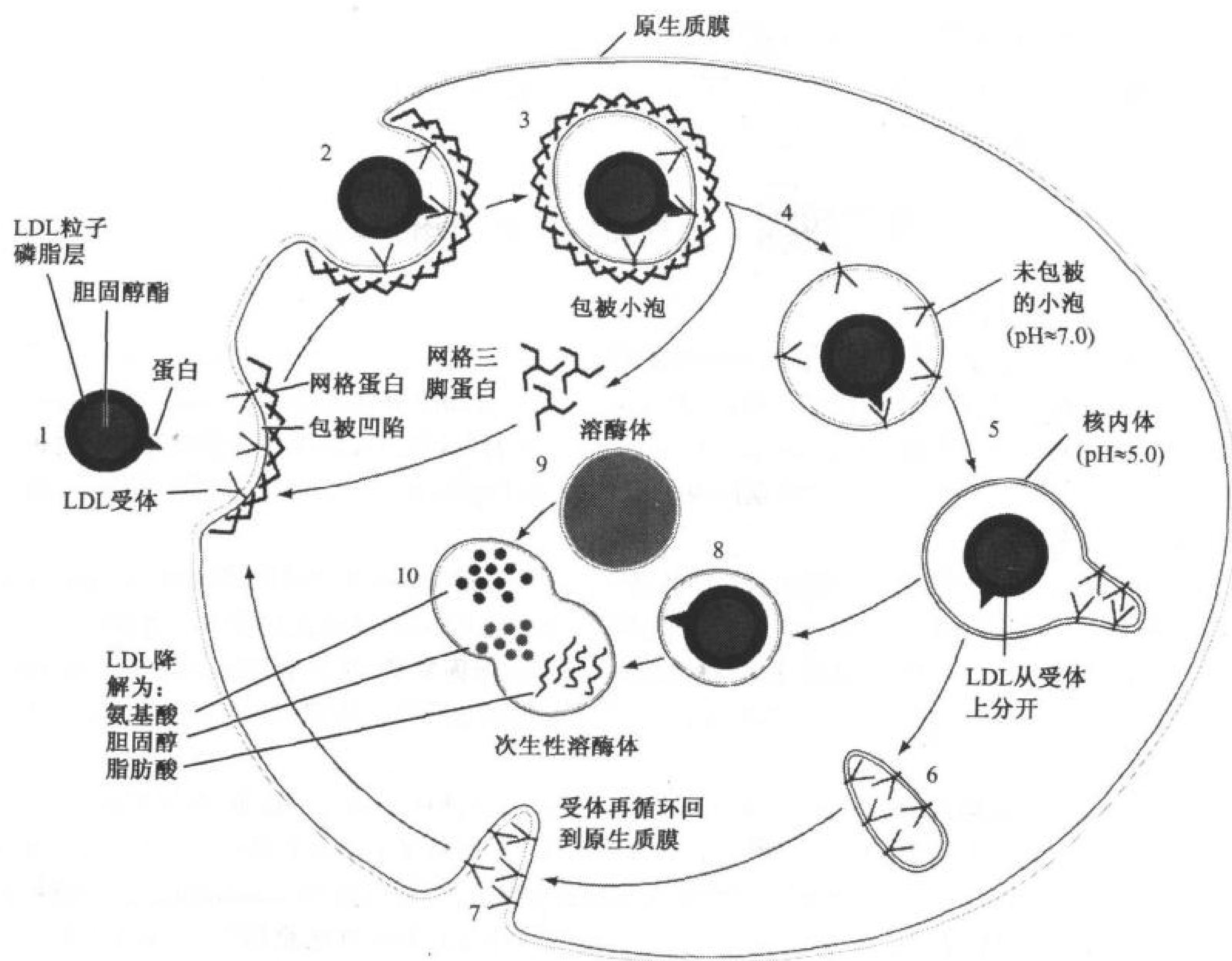
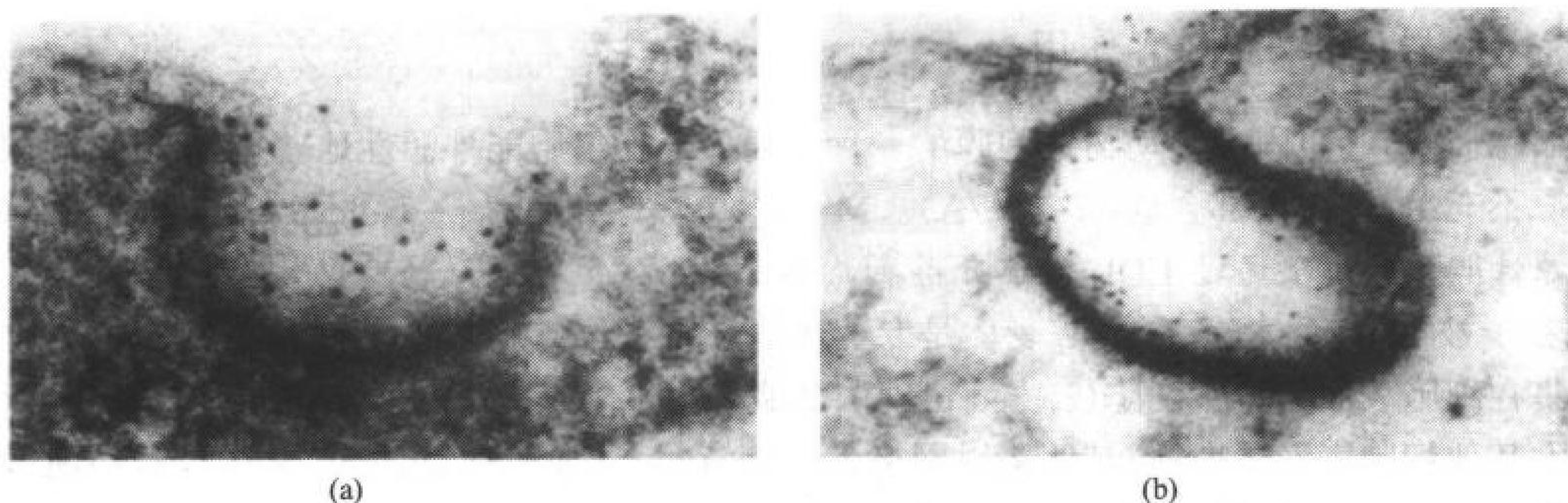


图 10-27　*功能的秘诀*：LDL 受体介导的内吞作用

LDL 专一性地和包被凹陷中的 LDL 受体结合(1)。LDL 和其受体结合后，陷入细胞中(2)，形成包被小泡(3)，包被小泡的网格蛋白层解聚为三脚蛋白体，结果形成平滑表面的小泡(4)，这些小泡与称为核内体的小泡融合(5)，核内体的内部 pH 为 5.0 左右，其酸性诱导 LDL 和其受体解离。LDL 积聚在核内体的小泡中，而 LDL 受体集中在附着的管形结构的膜中，然后与核内体分开(6)。LDL 受体再循环回到原生质膜(7)，核内体的小泡部分(8)和溶酶体(9)融合生成**次生性溶酶体**(secondary lysosome)(10)，在此处 LDL 的apoB-100成分和胆固醇酯被水解。



(a) (b)

图 10-28 显示培养的人成纤维细胞对 LDL 内吞作用的电子显微镜照片

LDL 和铁蛋白(一个传送铁的蛋白质)结合表现为黑点(a) LDL 和细胞表面的包被凹陷结合。(b) 包被凹陷陷入,并开始从细胞膜上收缩,形成含有结合LDL的包被小泡。[引自 Anderson, R. G. W., Brown, M. S., and Goldstein, J. L., Cell 10, 356 (1977). Copyrigkt © by Cell Press]

264

受体介导的内吞作用是一个普遍的机制,细胞通过各自相应的专一受体摄取大分子。许多细胞表面受体和 LDL 受体一样,在质膜和核内体区室间再循环,即使没有配体时也如此。LDL 受体进出细胞的循环约每 10min 一次,LDL 受体系统缺陷,导致血液循环中胆固醇异常的高水平,伴随发生心脏疾病的危险增加(见框 10-1)。

框 10-1 健康和疾病的生物化学

胆固醇和动脉粥样硬化

西方工业化国家最通常引起死亡的是**心肌梗塞**(myocardial infarction)[心脏病(heart attack)],患者的心肌血流阻断,导致心脏组织死亡。冠状动脉的阻塞通常是**动脉粥样硬化**(atherosclerosis)的结果。动脉硬化是一种进行性疾病,以动脉内壁平滑肌细胞中的脂肪沉积开始,最终病灶变成纤维状的钙化斑块,使动脉变狭窄甚至阻塞。最初的动脉增厚几乎含有纯胆固醇酯,因此,动脉硬化的进展与血液中胆固醇的水平密切相关。

经由 LDL 运送到细胞的胆固醇掺入到细胞膜中。过量的胆固醇被转变成胆固醇酯,并通过 HDL 转运到肝脏,在肝脏中被转化成**胆汁酸**(bile acid)形式,分泌进入小肠(在这里这些去污剂样分子促使脂类的消化和吸收)。可导致动脉硬化病变的血液循环中的胆固醇量,取决于胆固醇在 LDL 和 HDL 之间的分配。例如,妇女 HDL 水平典型地要比男子高,心脏病也较少。胆固醇水平也随饮食、压力和内源胆固醇合成的水平而变化。

具有遗传性**家族高胆固醇血症**(familial hypercholesterolemia, FH)的纯合子细胞,不能摄取 LDL,因为遗传学上它们缺乏 LDL 受体蛋白,所以,这些个体血浆中胆固醇水平要比平均水平约 175mg/100ml 高出许多,过量的胆固醇以黄色小结形式沉积在皮肤和肌腱上,被称为**黄瘤**(xanthomas),更为重要的是也可沉积在动脉中。结果,这些个体在其幼儿时期就显现出冠状动脉疾患的症状,而 FH 杂合子(500 人中有一人)个体,这种疾病的影响就不太严重;他们显现出冠状动脉疾患的症状要在 30 岁之后。

心脏疾患的非遗传危险因素包括吸烟,吸烟氧化 LDL,促使其被巨噬细胞(白细胞中的一种)摄取,因此,抽烟者比不抽烟者更有可能产生动脉粥样硬化。

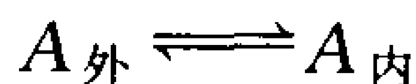
临床治疗高水平胆固醇并不简单,因为有许多因素影响胆固醇的合成、转运和在动脉中的沉积。某些病例减少饮食中的胆固醇可降低血浆胆固醇的水平。选择性吸收胆汁(胆固醇降解产物,正常在肝和小肠间再循环)的物质,有助于减低胆固醇的水平。目前对动脉硬化最有效的治疗是服用抑制胆固醇生物合成的药物(节 19-7A),虽然很难治疗。

4. 跨膜运输

发生在细胞或细胞器中的代谢反应和它们的周围环境被膜所分开。生物膜的非极性核使它们对大多数离子和极性物质高度不通透，只有通过专一的**转运蛋白**(transport proteins)才能跨越膜。转运蛋白介导小无机离子和诸如氨基酸、糖和核苷酸等代谢物的所有跨膜运动；蛋白质和大分子聚合体等较大物质就需要更为复杂的过程(例如内吞作用)。在这一节中，我们要讨论某些膜运输体系的热力学及其化学机制。

A. 运输的热力学

物质在膜的两侧扩散



$$A_{外} \rightleftharpoons A_{内}$$

在热力学上类似化学平衡。我们在节 1-4D 学过溶质 A 的自由能随其浓度的变化：

$$\overline{G}_A - \overline{G}_A^{0'} = RT\ \ln[A] \qquad [10\text{-}1]$$

此处，$\overline{G}_A$ 是 A 的**化学势**(chemical potential)(部分摩尔自由能)，"-"表示摩尔量，$\overline{G}^{0'}_A$ 是标准状态下 A 的化学势。因此，物质在膜两侧的浓度差异产生了**化学势差**(chemical potential difference)：

$$\Delta\overline{G}_A = \overline{G}_A(内) - \overline{G}_A(外) = RT\ \ln\left(\frac{[A]_{内}}{[A]_{外}}\right) \qquad [10\text{-}2]$$

所以，如果 A 在膜外的浓度大于膜内的浓度，A 从膜外转运到膜内时 $\Delta\overline{G}_A$ 将是负的，自发的 A 净流是向内的。但是如果 A 的内侧浓度大于外侧，则 $\Delta\overline{G}_A$ 是正的，要发生 A 的向内净流，只有和 ATP 水解的放能过程偶联，使总的自由能变化为负值才行。

离子的跨膜运动也导致膜两侧的电荷差异，由此产生电位差，$\Delta\psi = \psi(内) - \psi(外)$，此处 $\Delta\psi$ 被称为**膜电位**(membrane potential)。所以如果 A 是离子，方程式 10-2 必须修正，应包括从外到内跨膜运输 lmolA 所需的电势：

$$\Delta\overline{G}_A = RT\ \ln\left(\frac{[A]_{内}}{[A]_{外}}\right) + Z_A\mathscr{F}\Delta\psi \qquad [10\text{-}3]$$

此处 Z_A 是 A 的离子电荷；$\mathscr{F}$，法拉第常数，是 1mol 电子的电荷(96 485C·mol^{-1}；C 是库仑的符号)；$\overline{G}_A$ 现被称为 A 的**电化学势**(electrochemical potential)。活细胞的膜电位通常高达 －100mV(内侧为负值，注意 1V = 1J·C^{-1})。因此，方程 10-3 的最后一项往往对离子性物质是重要的，尤其是在线粒体和叶绿体内，这些我们将在第 17 章和第 18 章中介绍。

运输可以是介导性的或者是非介导性的

运输过程有两种类型：**非介导性运输**(nonmediated transport)和**介导性运输**(mediated transport)。非介导性运输通过简单的扩散进行，相反，介导性运输的进行要通过特定的载体蛋白的作用。物质通过介质的非介导性流动的驱动力是化学势能梯度。因此，*物质扩散是向消除其浓度梯度的方向进行，而且扩散速度与浓度梯度的大小成比例，也取决于物质在膜的非极性核中的溶解度*。所以，固醇和氧这类非极性分子，容易通过生物膜，根据它们的浓度梯度以非介导性运输扩散。出人意料的是，水很容易跨越脂双层扩散，水虽是极性的，但其体积小并有很高的浓度(相对于其他的小分子)允许它们跨膜迅速达到平衡。

266

介导性运输根据体系的热力学可分为两类：

1) **被动介导性运输**(passive-mediated transport)或易化扩散，在这种运输中，特定的分子从高浓度流向低浓度。
2) **主动运输**(active transport)，在这种运输中，特定的分子从低浓度流向高浓度，即逆浓度梯度运送，这是一种吸能过程，必须有足够的放能过程偶合，才有利于它的进行(即$\Delta G<0$)。

B. 介导性运输的机制

太大或太极性的物质靠它们自身很难跨越脂双层扩散，必须与载体分子复合后方可跨膜运送，载体分子有各种各样，分别称为**载体**(carrier)、**通透酶**(permease)、**转运体**(porter)、**移位酶**(translocase)和**运输体**(transporter)。

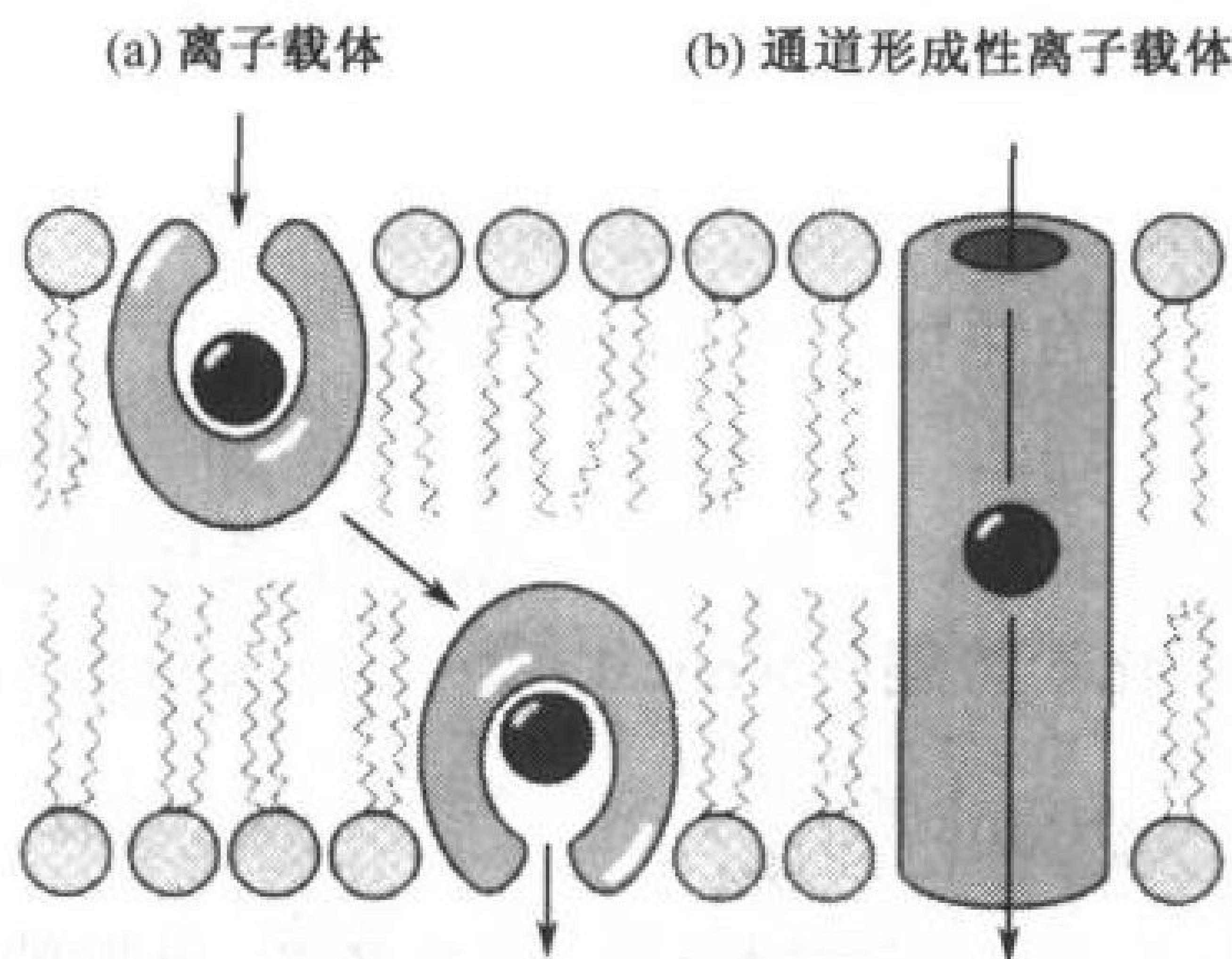


图 10-29 离子载体的作用
(a) 离子载体通过脂双层扩散运送离子。(b) 通道形成性离子载体，通过跨膜通道使离子扩散。

离子载体促进离子扩散

离子载体(ionophore)是载体分子的一种类型，是一种有机分子，多数情况下是源于细菌的抗生素。**载体性离子载体**(carrier ionophore)增加膜对特定离子的通透性，从而通过膜扩散并在膜的另一侧释放出该离子(图 10-29a)。为能进行净运输，未复合的离子载体必须再回到膜的原先一侧，准备重复这一过程，因此所有载体的离子复合物在非极性溶剂中应是可溶的。离子载体的第二种类型是**通道形成性离子载体**(channel-forming ionophore)，形成充满溶剂的跨膜通道或孔，能使选择性的离子扩散通过(图 10-29b)。

即使极少量的离子载体也能大幅度地增加膜对特定离子的通透性。例如，单分子的抗生素**缬氨霉素**(valinomycin)载体，跨膜运送 K^+ 高达每秒 10^4 个，而通道形成性离子载体，如抗生素**短杆菌肽 A**(gramicidin A)，K^+ 每秒的通过量高达 10^7。这些离子载体的抗生素性质产生于它们能去除健康细胞主动维持离子浓度梯度的能力。特别要注意，因为离子载体允许离子被动地在任一

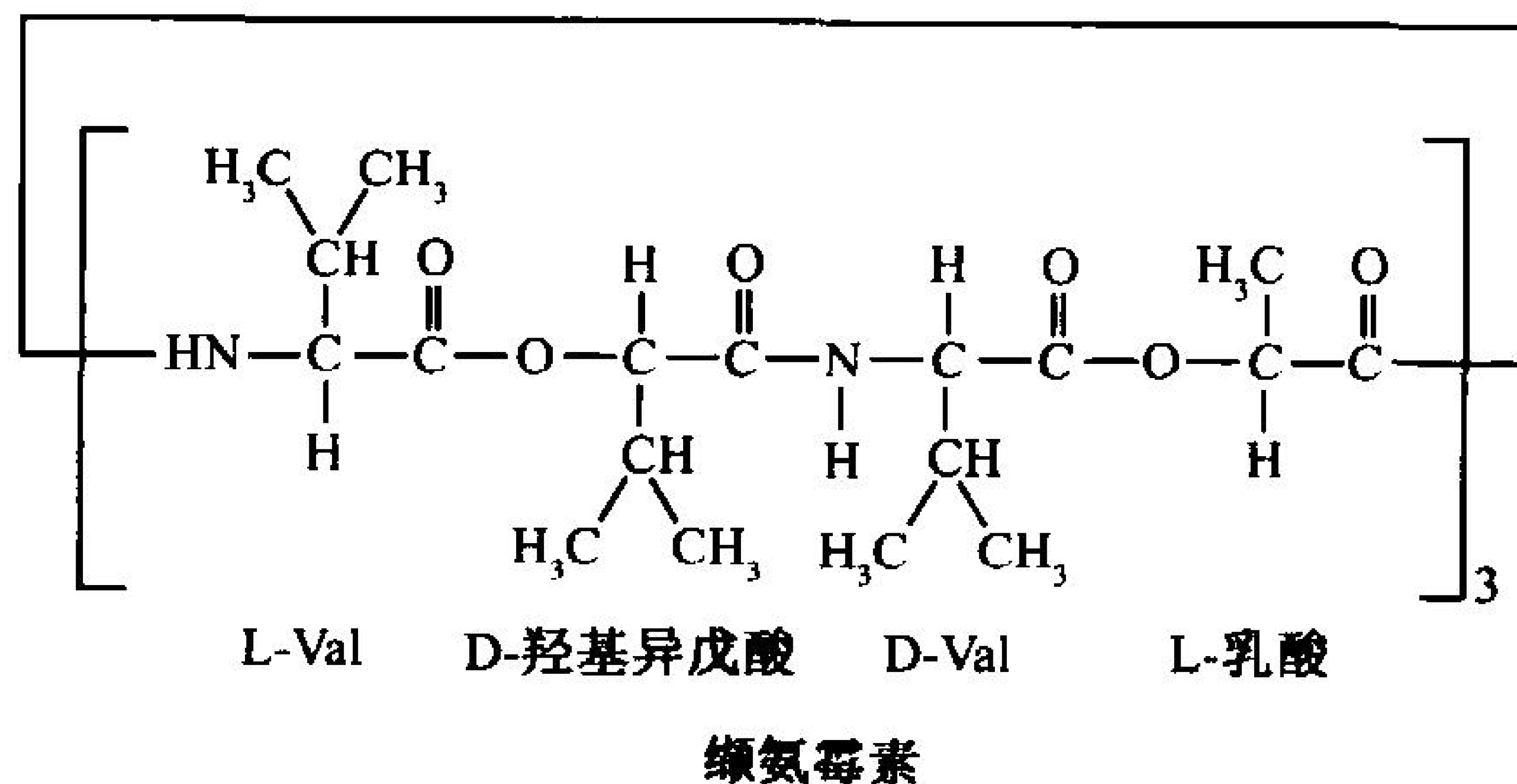


图 10-30 缬氨霉素
这个环状离子载体含有酯和酰胺键、D-及 L-氨基酸。

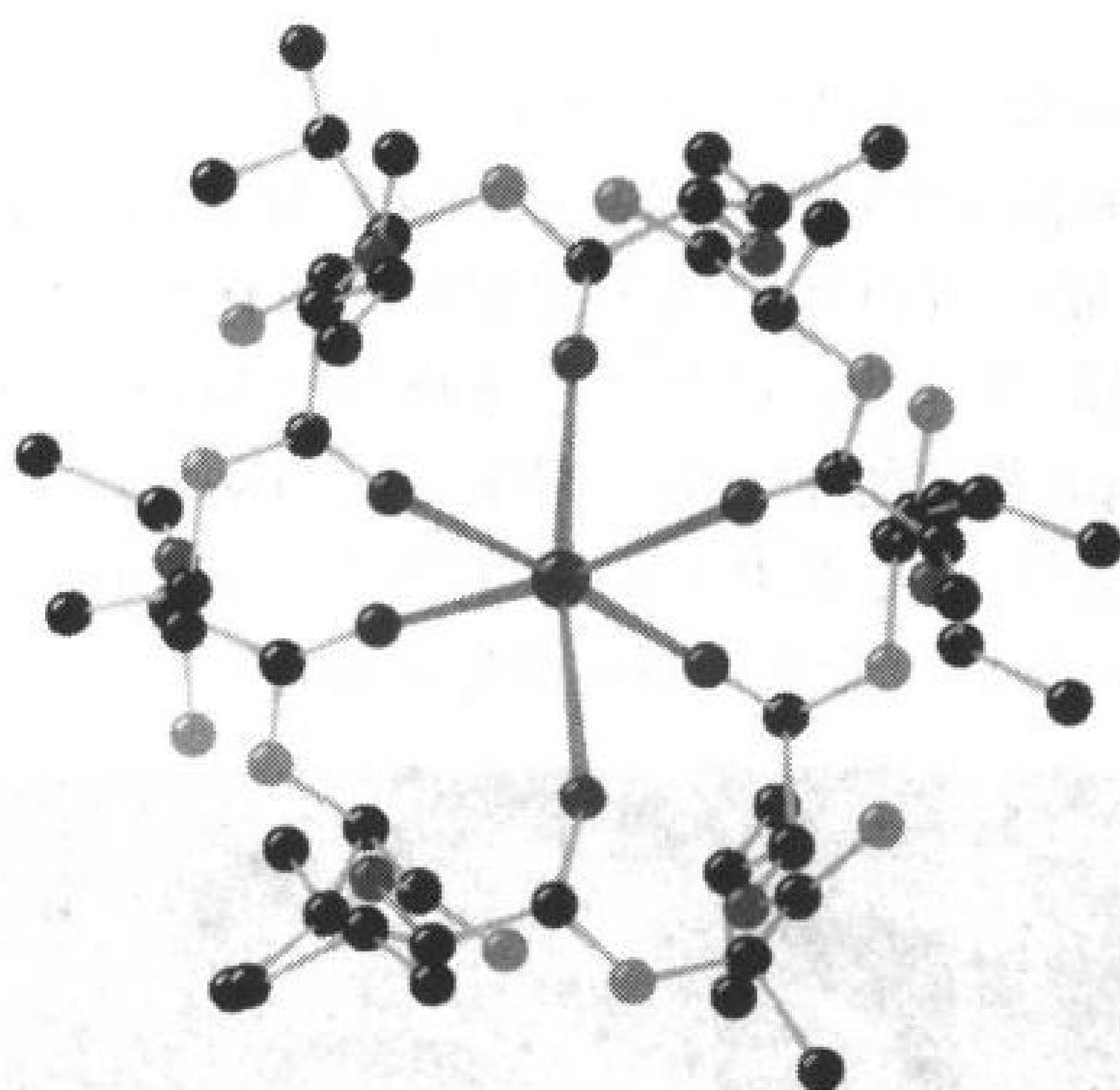


图 10-31　缬氨霉素与 K^+ 复合物的 X 射线结构

6 个氧原子(暗红色)八面体配位 K^+(紫色)。[引自 Neupert-Laves, K. and Dobler, M., Helv. Chim. Acta 58, 439(1975)]

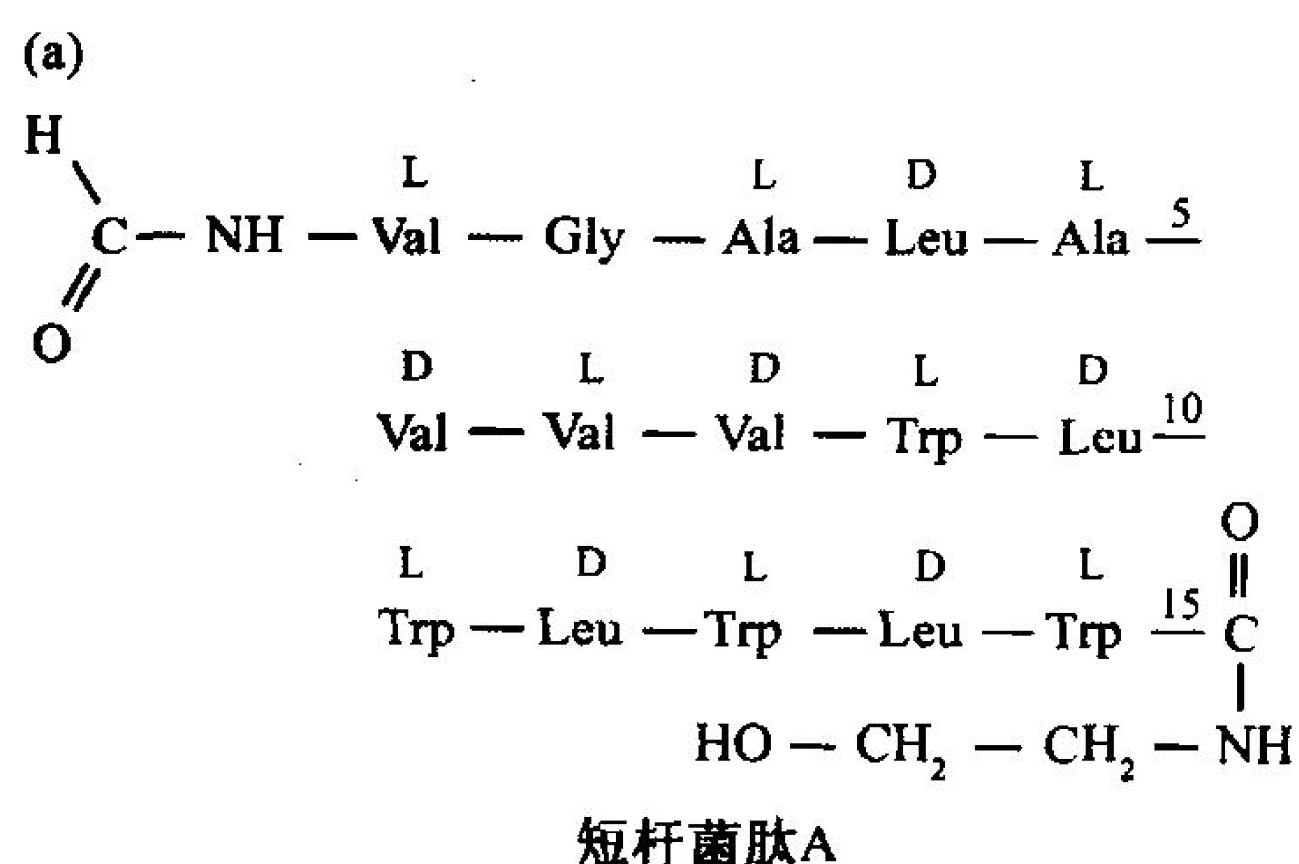
方向上跨膜扩散,它们仅能耗费——不是产生——离子浓度梯度。

缬氨霉素是已鉴定的最佳离子载体之一,特别在结合 K^+ 方面。它是个环状分子,包含 D-和 L-氨基酸残基参与的酯键和肽键(图 10-30)。缬氨霉素和 K^+ 复合物的 X 射线结构(图 10-31)表明,K^+ 与缬氨霉素的 6 个 Val 残基的羰基呈八面体配位,而环状缬氨霉素主链则围绕 K^+ 的配位外壳。甲基和异丙基侧链向外投射,提供了复合物的非极性外表,从而使它可溶于脂双层的疏水核。

267

K^+(离子直径 $r = 1.33Å$)紧密嵌入缬氨霉素的配位中心,但这一位点对 Na^+($r = 0.95Å$)或 Li^+($r = 0.60Å$)都太大,以至于不能与 6 个羰基氧配位。因此,缬氨霉素对 K^+ 的结合亲和性要比 Na^+ 高一万倍。还没有其他的已知物质对 Na^+ 和 K^+ 之间的识别会如此精确。

短杆菌肽 A 是由 15 个交替排列的 L 和 D 残基组成的线性多肽,所有这些残基都是疏水性的(图 10-32a)。核磁共振(NMR)和 X 射线晶体学证明,短杆菌肽 A 以头对头方式二聚化,形成跨膜通道(图 10-32b)。短杆菌肽 A 交替排列的 L 和 D 残基,允许它构成一个 4Å 直径的非极性外表螺旋和一个利于 Na^+ 和 K^+ 通过的极性中央通道。



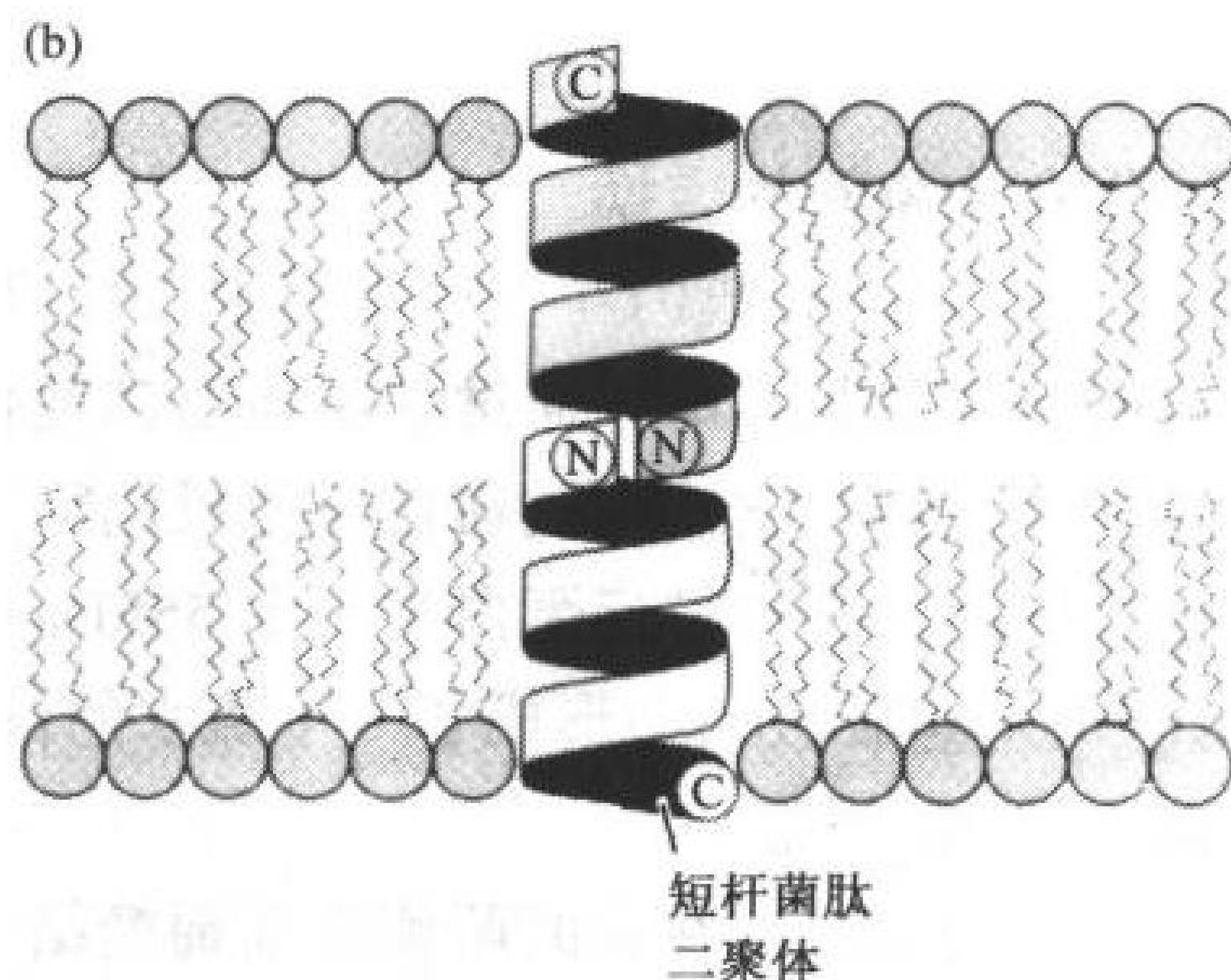


图 10-32　短杆菌肽 A

(a) 交替排列的 D-和 L-氨基酸,构成 15 肽,其 C 端和 N 端都是封闭的。(b) 两个短杆菌肽的镶嵌分子通过它们的 N-甲酰端(N)之间的氢键二聚化形成一个跨膜通道。

膜孔蛋白是溶质选择性的

大肠杆菌 OmpF 膜孔蛋白的 β-桶状结构(图 10-6)具有一个水溶液通道,这一通道被限止在它的中央,形成一个最小横断面为 7Å×11Å 的椭圆形孔(图 10-33),因此大于 600Da 的溶质分子就不能通过此通道。OmpF 膜孔蛋白对阳离子有微弱的选择性,但 63%相同的大肠杆菌 PhoE 膜孔蛋白则对阴离子有微弱的选择性。这种离子选择性的差别,大体上的解释是由于 PhoE 的 131 位上具有 Lys,而在 OmpF 相应的 131 位上则是 Gly。Lys131 的侧链突入通道,并延伸到压缩区的一排碱性侧链衬壁,显然,静电性上 Lys131 有利于阴离子的通过,或许提供了阴离子结合位点,而通道口上额外的 Lys 侧链可能吸引阴离子进入通道。

268

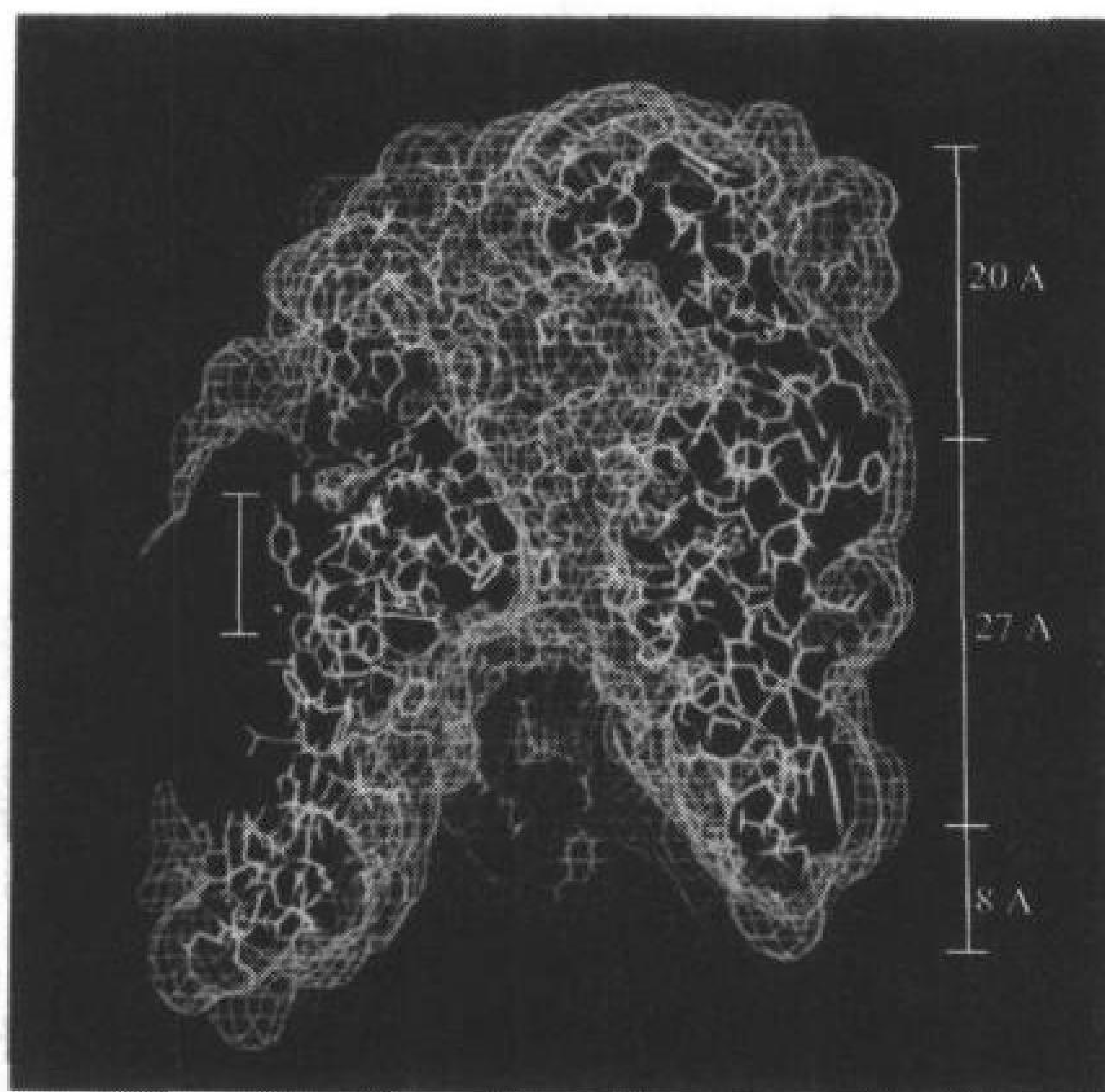


图 10-33　通过 OmpF 膜孔蛋白亚基微孔的纵剖面

网眼表示该蛋白质的溶剂可及表面(接触水的蛋白质部分),微孔最狭窄的部分约 9Å 长,在左边以短的垂直线表示,右边的垂直尺度与图10-6C相同。(引自 Tilman Schirmer and John Jansonius, University of Basel, Switzerland)

运输蛋白构象间的变换

如我们所知,膜内在蛋白在膜中有特定的方向,由于蛋白质的翻转速度微不足道,这类蛋白质不能像离子载体那样通过扩散运送其他物质。和膜孔蛋白不同,介导性运输蛋白不含敞开的溶液通道,然而,它能通过通道或孔机制运作。

红细胞葡萄糖转运蛋白是一个 55kDa 的糖蛋白,根据序列分析,它有 12 个跨膜螺旋(图 10-34)。这些螺旋被认为形成了一个疏水的圆柱体,围绕着亲水的通道,通过这个通道葡萄糖从胞外液运入胞质中。

这个转运蛋白在膜的两侧有葡萄糖结合位点。John Barnett 指出,在葡萄糖 C1 位上添加一个丙基会阻止葡萄糖与膜外表的结合;而添加一个丙基到葡萄糖的 C6 上,则会妨碍葡萄糖与内膜的结合,因此他提出这种跨膜蛋白具有两种交替的构象:一种构象的葡萄糖结合位点面向细胞外表面,需要 O1 的接触和自由的 O6,另一种构象的葡萄糖结合位点面向细胞内表面,需要 O6 的接触而 O1 是自由的。表观上运输进行如下(图 10-35):

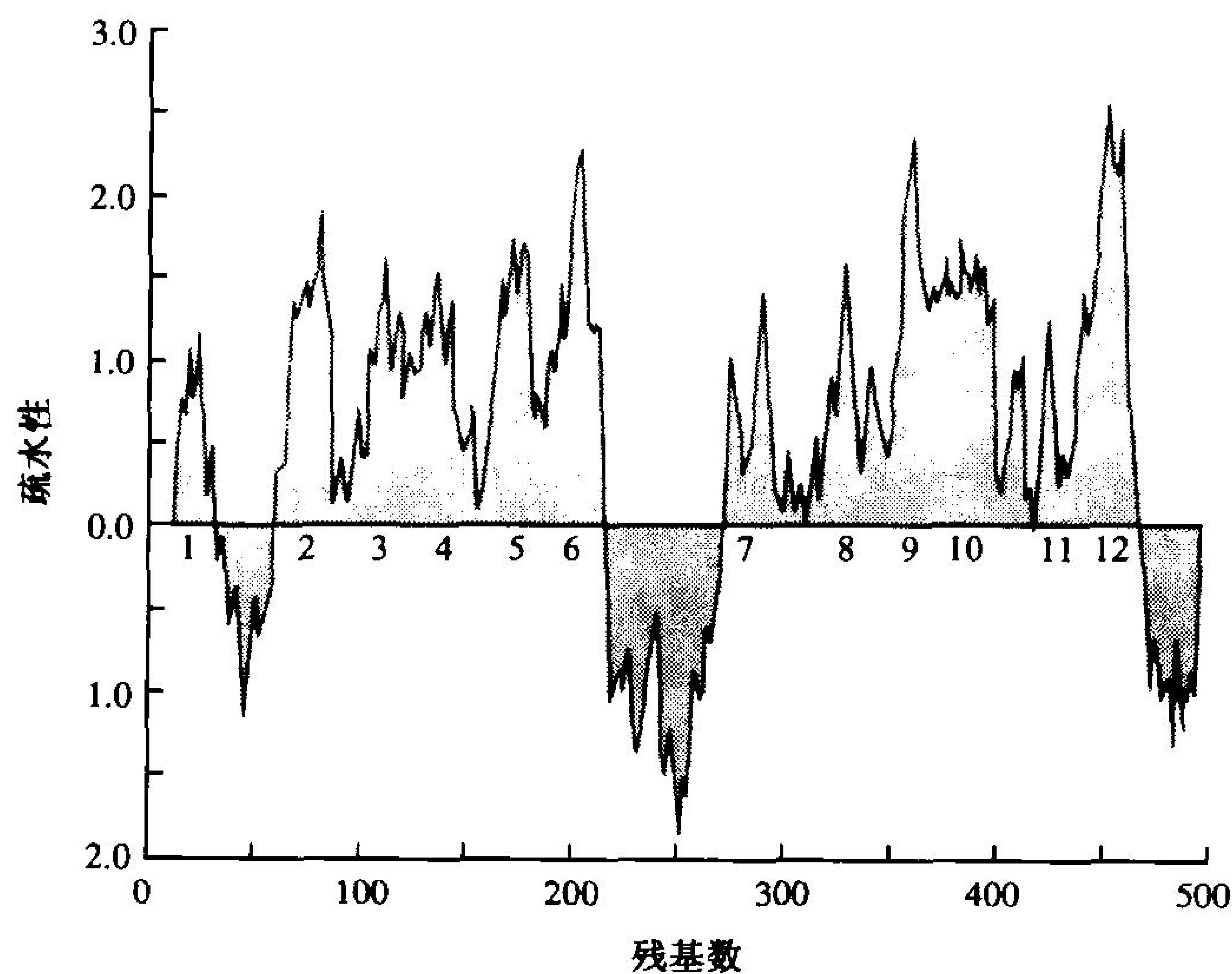


图 10-34　人红细胞葡萄糖转运蛋白的亲水性图

该图根据在 21 个残基(足以形成一个跨膜 α 螺旋)的滑动窗口内的平均亲水性(表 6-2)绘制，将这些平均值对滑动窗口的中间位置残基作图。数目表示有 12 个可预测的跨膜区域。[引自 Mueckler, M., Caruso c., et al. Science 229. 944(1985)]

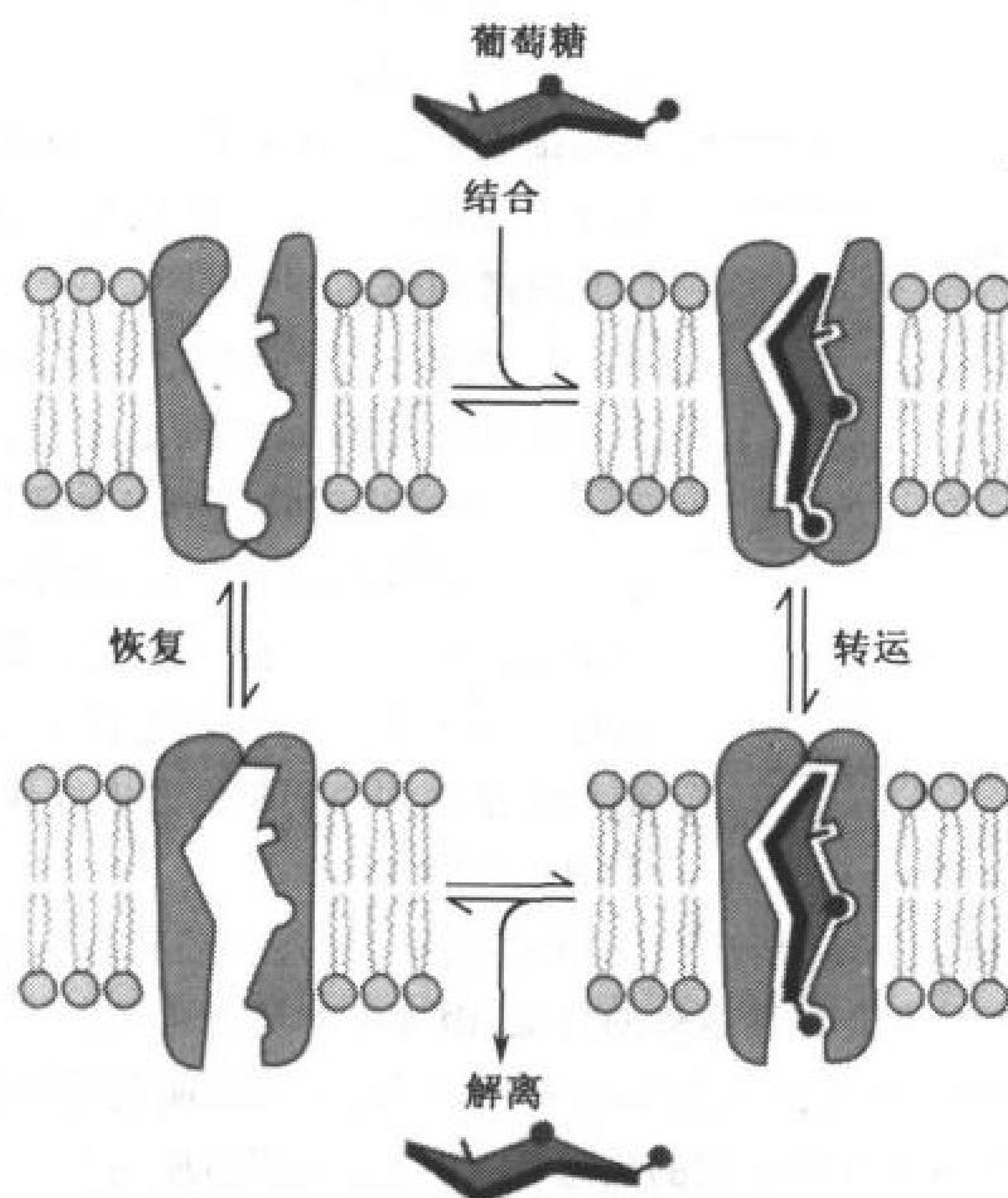


图 10-35　功能的秘诀：葡萄糖转运蛋白的模型

该转运蛋白在两种相互惟一的构象间转换，葡萄糖结合在膜的一侧，蛋白质构象变化后在膜的另一侧被释放，葡萄糖分子(红色)按比例绘制。[引自 Baldwin, S. A. and Lienhard, G. E., Trends Biochem Sci. 6, 210 (1981)]

1）葡萄糖和膜一侧的蛋白质结合。

269　2）构象转变，关闭最初的结合位点，暴露出膜另一侧面的结合位点。

3）葡萄糖从蛋白质上解离出来。

4）在缺乏结合葡萄糖的情况下，葡萄糖转运蛋白逆转到它的原初构象，转运循环完成。

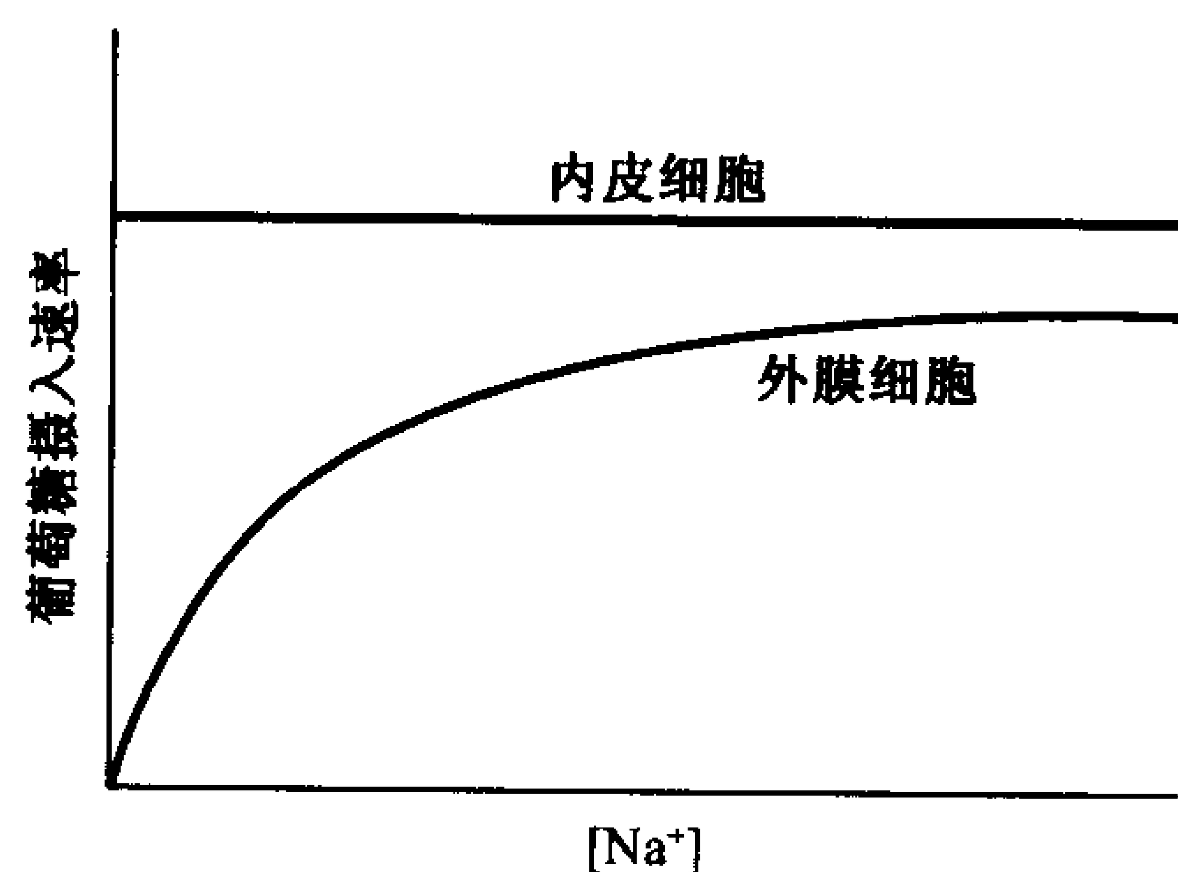
这种转运循环的进行可以是双向的，依赖于细胞外与细胞内的葡萄糖相对浓度。葡萄糖转运蛋白提供了跨红细胞膜平衡葡萄糖浓度的一种方式，这一方式并不伴有任何小分子或离子的泄漏（一直开启的通道如膜孔蛋白，可能有小分子或离子的泄漏）。

270　*所有已知的转运蛋白似乎都是不对称性占位的跨膜蛋白，它们能在两种构象状态间转换，在这些构象中，配体结合位点依次暴露于膜的相对两侧。*这一机制类似于血红蛋白 T→R 的变构转换（节 7-2）。事实上，像肌红蛋白和血红蛋白这类配体结合蛋白质的许多特征，也适用于转运蛋白（框 10-2）。

框 10-2　生物化学焦点

介导性转运和非介导性转运的区别

葡萄糖和许多其他化合物能通过非介导性途径进入细胞，亦即它们缓慢扩散进入细胞的速度与它们的膜溶解性和膜两侧的浓度成正比。这是一个线性过程：物质跨膜的流量（单位面积转运的速率）随着浓度梯度（细胞内外之间浓度的差别）值的增加而增加。同一物质，以葡萄糖为例，如果通过转运蛋白跨膜运输，它的流量不再是线性的，这是区别介导性运输和非介导性运输 4 个特征中的一个。



［引自 Stein，W. D.，*Movement of Molecules across Membranes*，p. 134，Academic press(1967)］

1. 速度和专一性。化学上相似的 D-葡萄糖和 D-甘露醇，在合成的脂双层中的溶解度是相似的，但是葡萄糖透过红细胞膜的速度要比 D-甘露醇快 4 个数量级。因此，红细胞膜一定具有一个转运葡萄糖、并能区分 D-葡萄糖与 D-甘露醇的体系。

2. 饱和。葡萄糖转运入红细胞的速度并不随胞外葡萄糖浓度的增加而无限地增加：速度逐渐接近一个最大值，这一观察证明膜上特定数量的位点参与了葡萄糖的转运。在高浓度葡萄糖下，转运蛋白变为饱和，与在高氧分压下氧饱和肌红蛋白的情况类似（图 7-4）。正如所料，葡萄糖流量对葡萄糖浓度的作图是双曲线。非介导性的葡萄糖流量增加与葡萄糖浓度成线性关系，但不会看到偏离上图标尺的基线。

3. 竞争。当有和葡萄糖竞争结合转运蛋白的物质存在时，上述曲线右移；例如，6-O-苄基-D-半乳糖就具有这种效应。竞争不是非介导性运输的特征，因为未涉及转运蛋白。

4. 失活。蛋白质被化学试剂修饰从而影响其功能后，可消除葡萄糖快速且饱和地进入红细胞。红细胞葡萄糖转运系统对蛋白质修饰试剂的敏感性，说明它是蛋白质的又一个证据。

有些转运蛋白同时转运不只一种物质，因此介导性运输可根据转运过程的化学计量予以分类（图 10-36）：

1）**单向转运**（uniport）：一次只涉及单一分子的运动。红细胞葡萄糖转运蛋白就是单向转运系统。

2）**同向转运**（symport）：在同一方向上同时转运两个不同的分子。

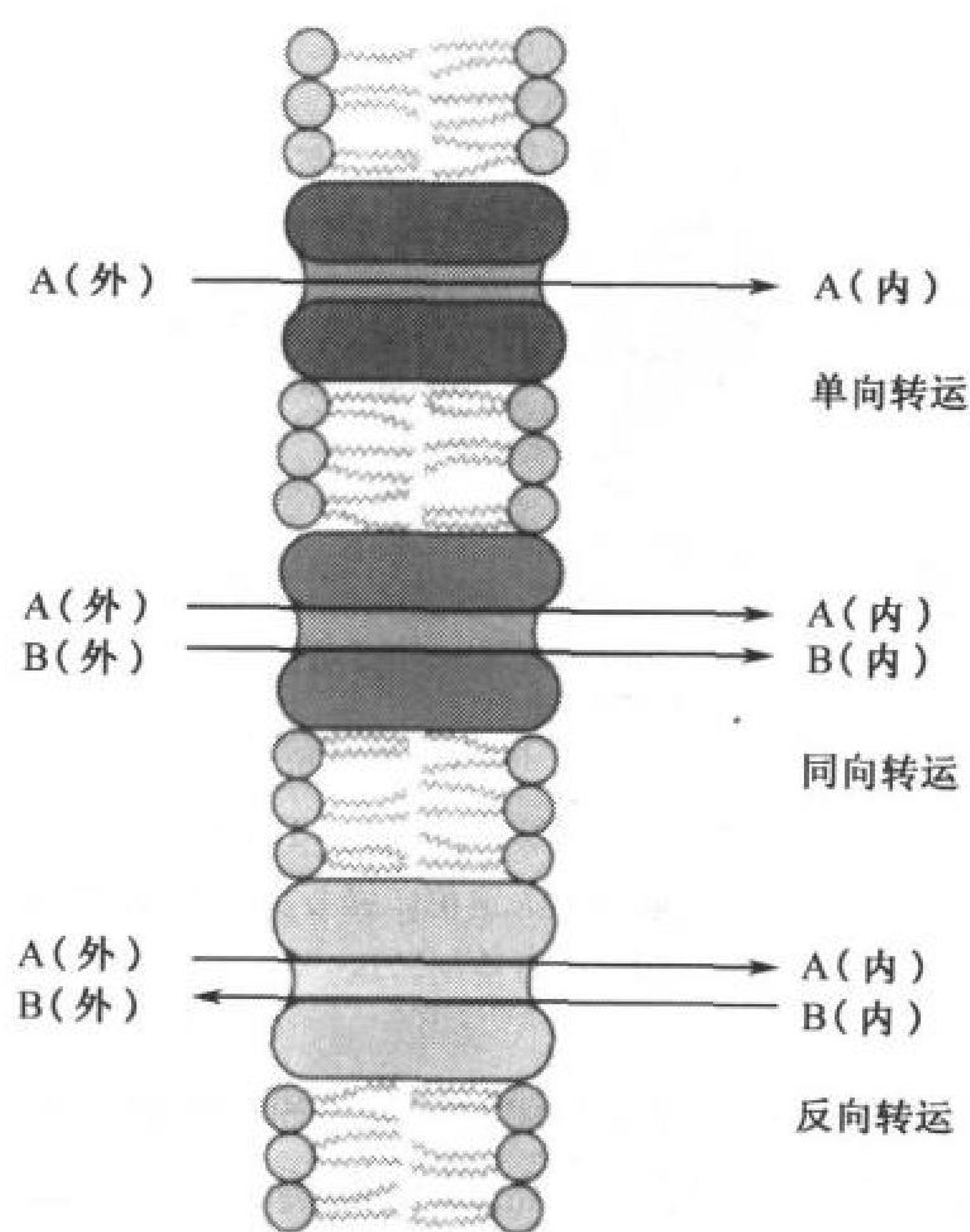


图 10-36 单向转运、同向转运和反向转运系统

3) **反向转运**(antiport):在不同的方向上同时转运两个不同的分子。

C. ATP 驱动的主动运输

271

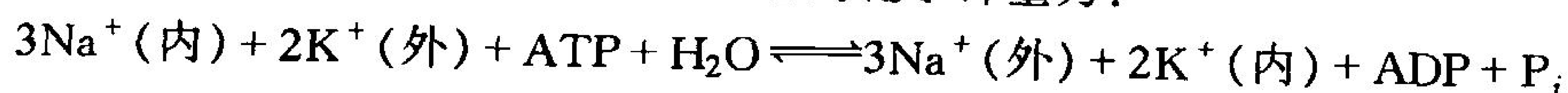
由于血浆中的葡萄糖浓度一般要比细胞中的高,红细胞葡萄糖转运蛋白通常把葡萄糖转运进红细胞,在那里葡萄糖被代谢。但许多物质在膜的一侧比膜的另一侧浓度更低。这类物质必须对抗其浓度梯度,主动并选择地被跨膜运输。

主动运输是一个吸能过程,大多数情况下,这一过程和 ATP 水解偶联。阐明 ATP 释放的化学能用于驱动机械过程的机制,至今还是一个挑战性的生物化学难题。在本节中,我们要探讨转运阳离子的膜结合 ATP 酶,这些蛋白质执行**初级主动运输**(primary active transport)。在**次级主动运输**(secondary active transport)中,由离子泵 ATP 酶产生的电化学梯度的自由能被用来对抗浓度梯度,从而转运中性分子。

$(Na^+\text{-}K^+)$-ATP 酶

在较高等真核生物的质膜中,研究得最透彻的主动转运系统是**$(Na^+\text{-}K^+)$-ATP 酶**,最早是由 Jens Skou 鉴定的。这个跨膜蛋白由两类亚基组成:一个 110kDa、包含酶的催化活性和离子结合位点的非糖基化的 α 亚基,一个 55kDa 功能尚不清楚的糖蛋白 β 亚基。序列分析提示,α 亚基有 8 个跨膜 α 螺旋片段和 2 个大的胞浆内结构域,β 亚基有单一的跨膜螺旋和一个大的细胞外结构域,该蛋白质在体内以$(\alpha\beta)_2$四聚体形式发挥功能(图 10-37)。

$(Na^+\text{-}K^+)$-ATP 酶常被称为**$(Na^+\text{-}K^+)$泵**[$(Na^+\text{-}K^+)$pump],因为它在水解细胞内 ATP 的同时,将 K^+ 泵入而将 Na^+ 泵出细胞,这个反应总的化学计量为:



$$3Na^+(内) + 2K^+(外) + ATP + H_2O \rightleftharpoons 3Na^+(外) + 2K^+(内) + ADP + P_i$$

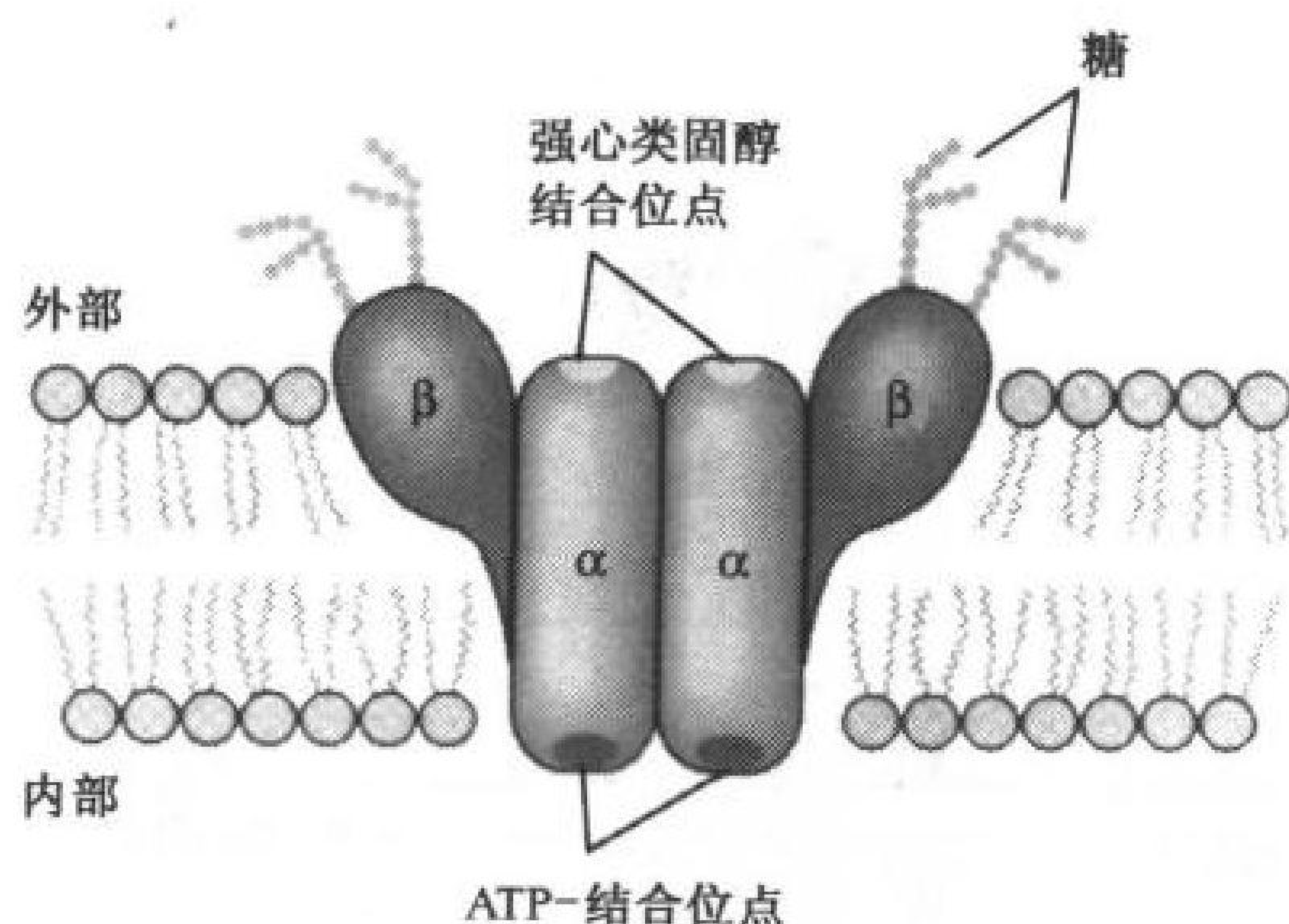
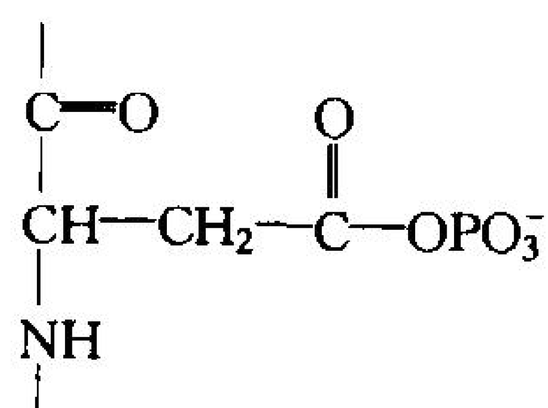


图 10-37 (Na^+-K^+)-ATP 酶

此图表示转运蛋白假定的二聚体结构及其在质膜上的定位。强心类固醇(框 10-3)结合在转运蛋白的外表面上,从而抑制转运。

(Na^+-K^+)-ATP 酶是反向运输,产生一个电荷的跨膜差别,因为每有二个正电荷进入细胞就有 3 个正电荷排出细胞。Na^+ 的这种排出,使动物细胞在渗透压上能控制它们的含水量:*没有(Na^+-K^+)-ATP 酶维持细胞内部 Na^+ 的低浓度,水就会渗透涌入细胞,使得缺少细胞壁的动物细胞肿胀和胀破*。由(Na^+-K^+)-ATP 酶产生的电化学梯度,也对神经细胞的电兴奋性有作用;事实上,所有细胞消耗大部分它们所制造的 ATP(神经细胞达 70%),用以维持它们所需的细胞质的 Na^+ 和 K^+ 浓度。



天冬氨酰磷酸残基

(Na^+-K^+)-ATP 酶的关键是该转运蛋白中一个特定的 Asp 残基的磷酸化,只有在 Na^+ 存在时,ATP 才磷酸化该转运蛋白;而天冬氨酰磷酸残基(左侧)只有在 K^+ 存在时才发生水解。这提示(Na^+-K^+)-ATP 酶有两种构象状态(称为 E_1 和 E_2),它们具有不同的结构、不同的催化活性和不同的配体专一性。(Na^+-K^+)-ATP 酶被认为是按下述方式运行的(图 10-38)。

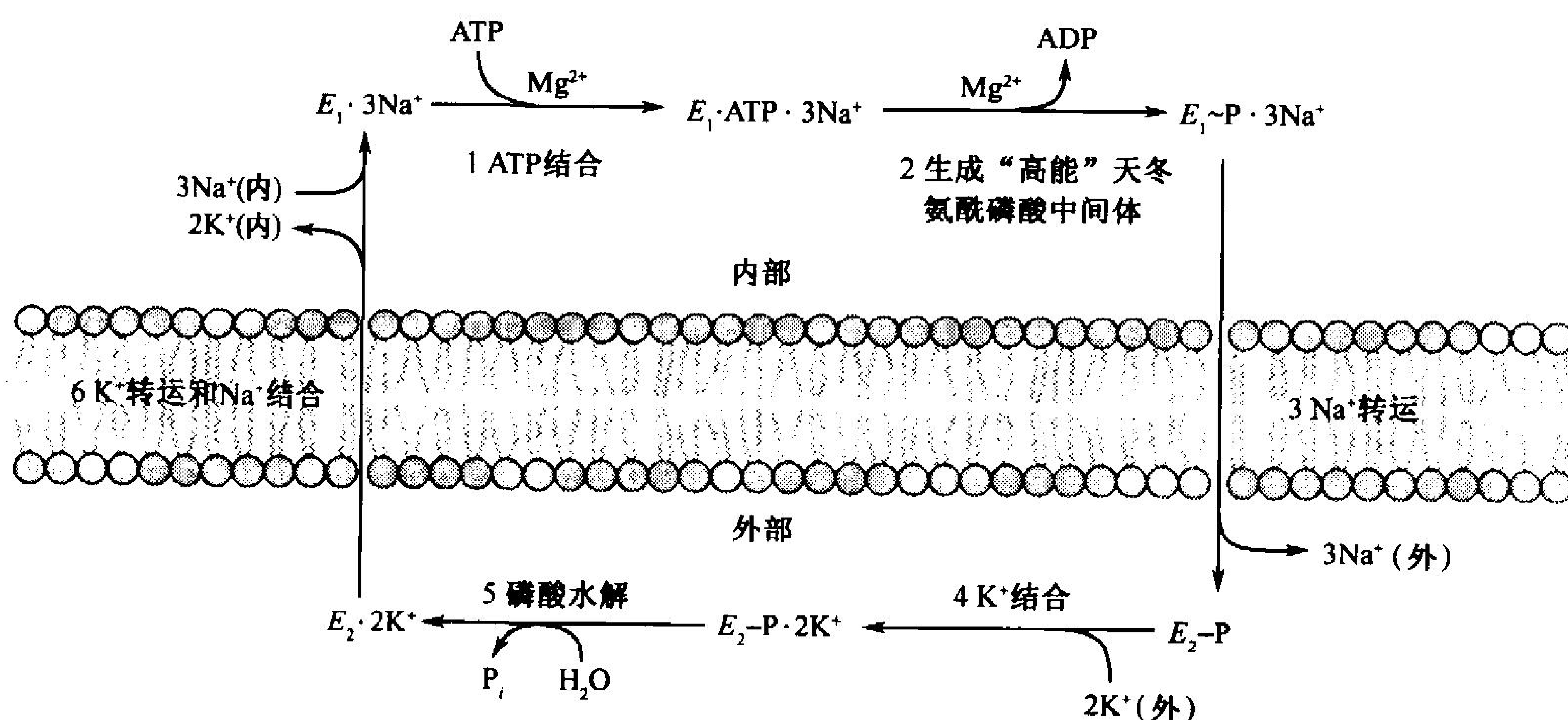


图 10-38 *功能的秘诀*:(Na^+-K^+)-ATP 酶主动转运 Na^+ 和 K^+ 的示意图

1) E_1 状态下的转运蛋白在细胞内部结合 3 个 Na^+，然后结合 ATP，生成 $E_1 \cdot ATP \cdot 3Na^+$ 复合物。　272

2) ATP 水解产生 ADP 和一个“高能”天冬氨酰磷酸中间体 $E_1 \sim P \cdot 3Na^+$（此处“～”表示“高能”键）。

3) “高能”中间体松弛成它的“低能”构象 $E_2 - P \cdot 3Na^+$，将其结合的 Na^+ 释放到细胞外部。

4) $E_2 - P$ 从细胞外部结合两个 K^+，生成 $E_2 - P \cdot 2K^+$ 复合物。

5) 磷酸基团被水解，生成 $E_2 \cdot 2K^+$。

6) $E_2 \cdot 2K^+$ 改变构象，在细胞内部释放出两个 K^+ 离子，并以 3 个 Na^+ 取代，并完成转运循环。

尽管上述反应的每一步单个是可逆的，但图 10-38 中示意的循环，在正常生理条件下只能按顺时针方向循环，这是因为 ATP 水解和离子转运是偶联的矢量（单方向性的）过程。这个反应循环的矢量性质是由某几步放能的 ATP 水解反应（步骤 1 + 2 和步骤 5）和某几步吸能的离子转运过程（步骤 3 + 4 和步骤 6）交替所致。因而，没有一个反应能进行完结，除非另一个反应终止。利用抑制转运蛋白的糖苷，极大地便利了对（Na^+-K^+）-ATP 酶的研究。

Ca^{2+}-ATP 酶

瞬间增加胞浆中的 Ca^{2+} 浓度，可激发许多细胞反应，包括肌肉收缩（节 7-3C），神经介质的释放和糖原分解（节 15-3）。而且，Ca^{2+} 是氧化代谢的一个重要激活剂（节 16-4）。

胞浆中的 Ca^{2+} 浓度（约 0.1μmol/L）比细胞外间隙低 4 个数量级［胞外约 1500μmol/L；否则胞内的 Ca^{2+} 可与磷酸生成 $Ca_3(PO_4)_2$，它的最大溶解度仅为 65μmol/L］。维持如此大的浓度梯度，靠的是跨质膜和内质网（肌肉中是肌浆网）的 Ca^{2+} 的主动运输，通过 **Ca^{2+}-ATP 酶（Ca^{2+} 泵）**，以 ATP 的水解为代价，主动将 Ca^{2+} 泵出胞浆（Ca^{2+} 也可通过不同的系统被泵入线粒体基质中，　273

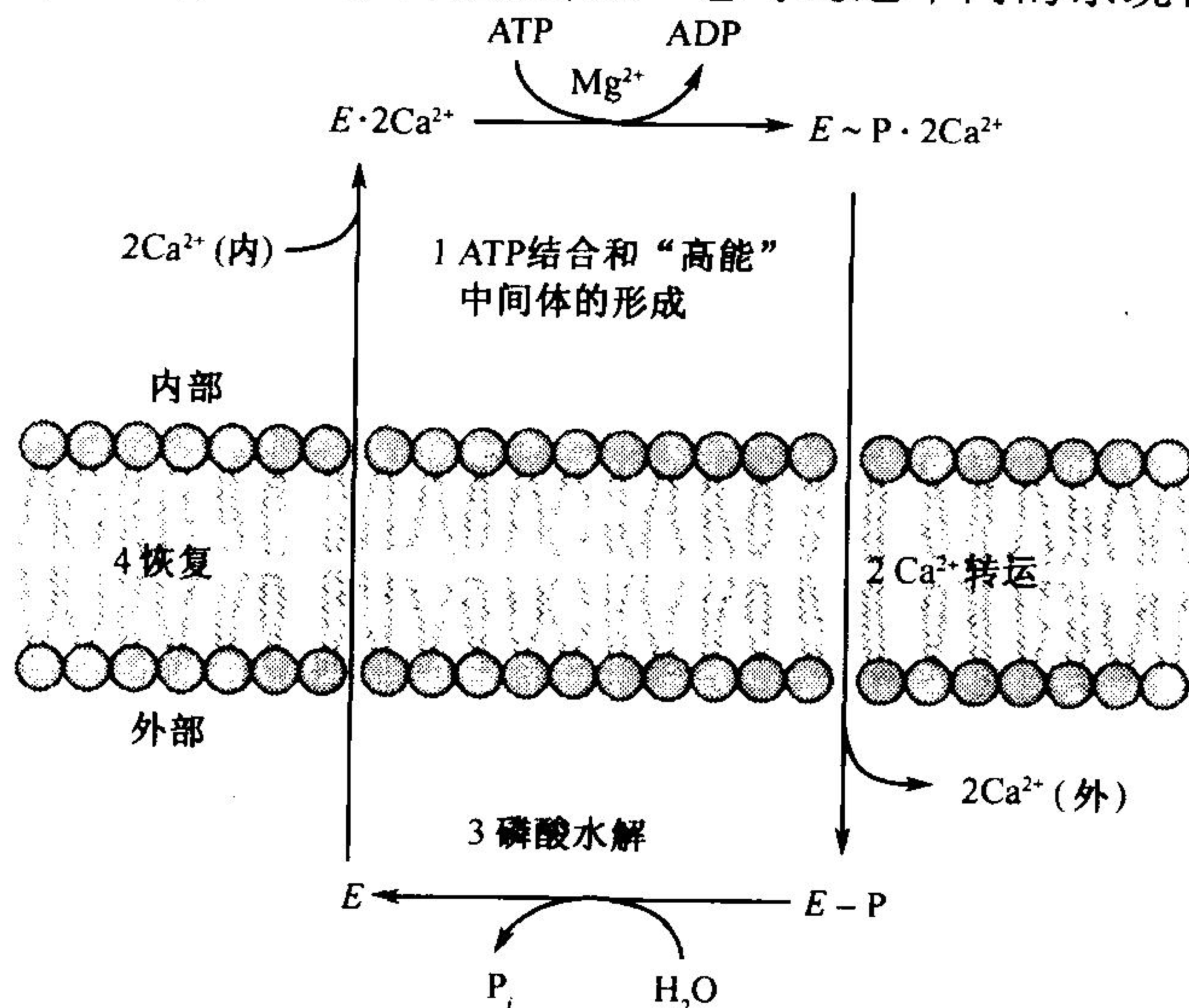


图 10-39　Ca^{2+}-ATP 酶主动运输 Ca^{2+} 的示意图

此处（内）指胞浆；（外）对质膜的 Ca^{2+}-ATP 酶而言，指细胞外面，对内质网膜上的 Ca^+-ATP 酶而言，指内质网（或肌浆网）的腔。

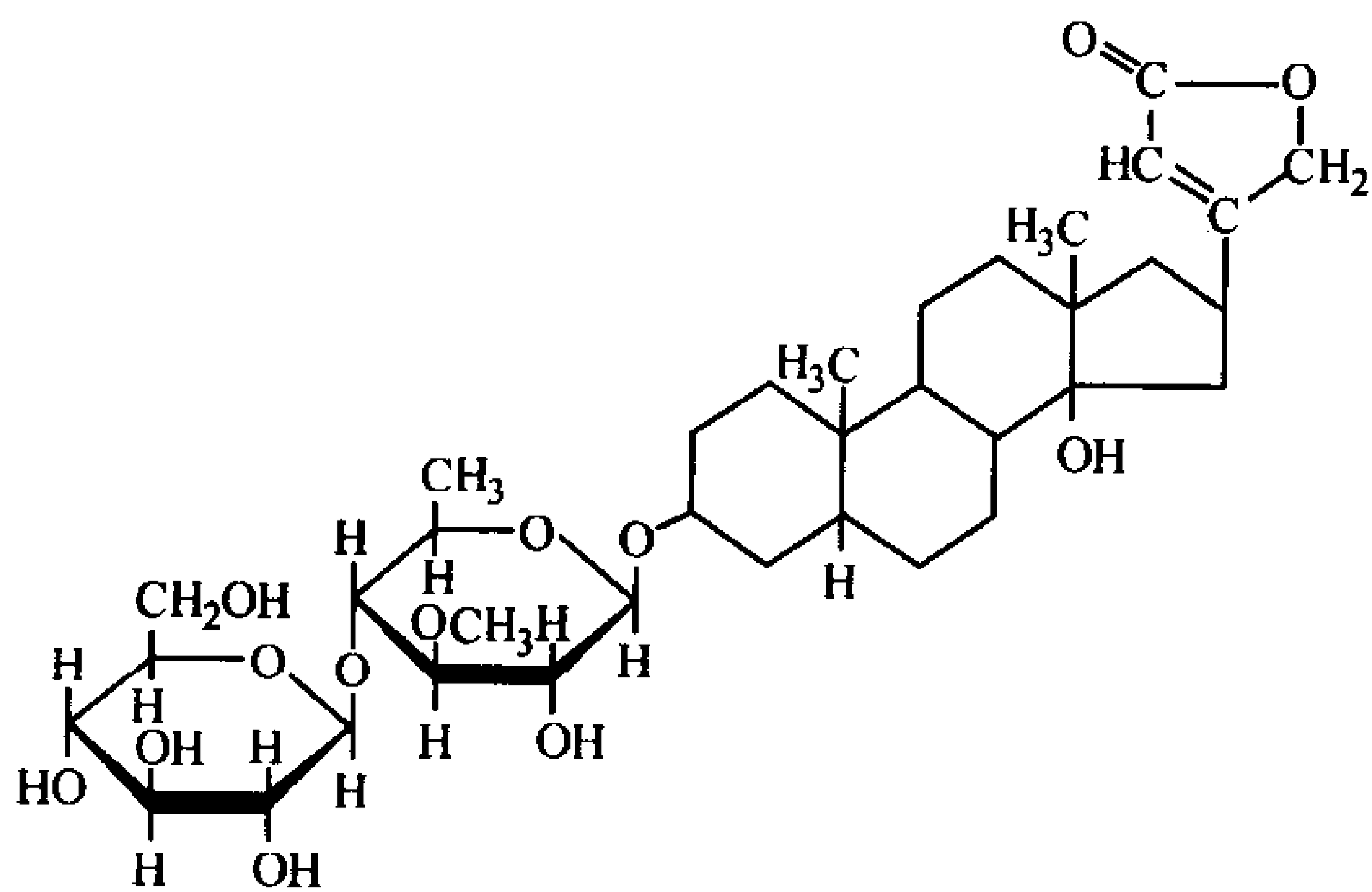
节 17-1B)。Ca^{2+}-ATP 酶(图 10-39)的作用机制类似于(Na^+-K^+)-ATP 酶(图 10-38)。

框 10-3 生物化学焦点

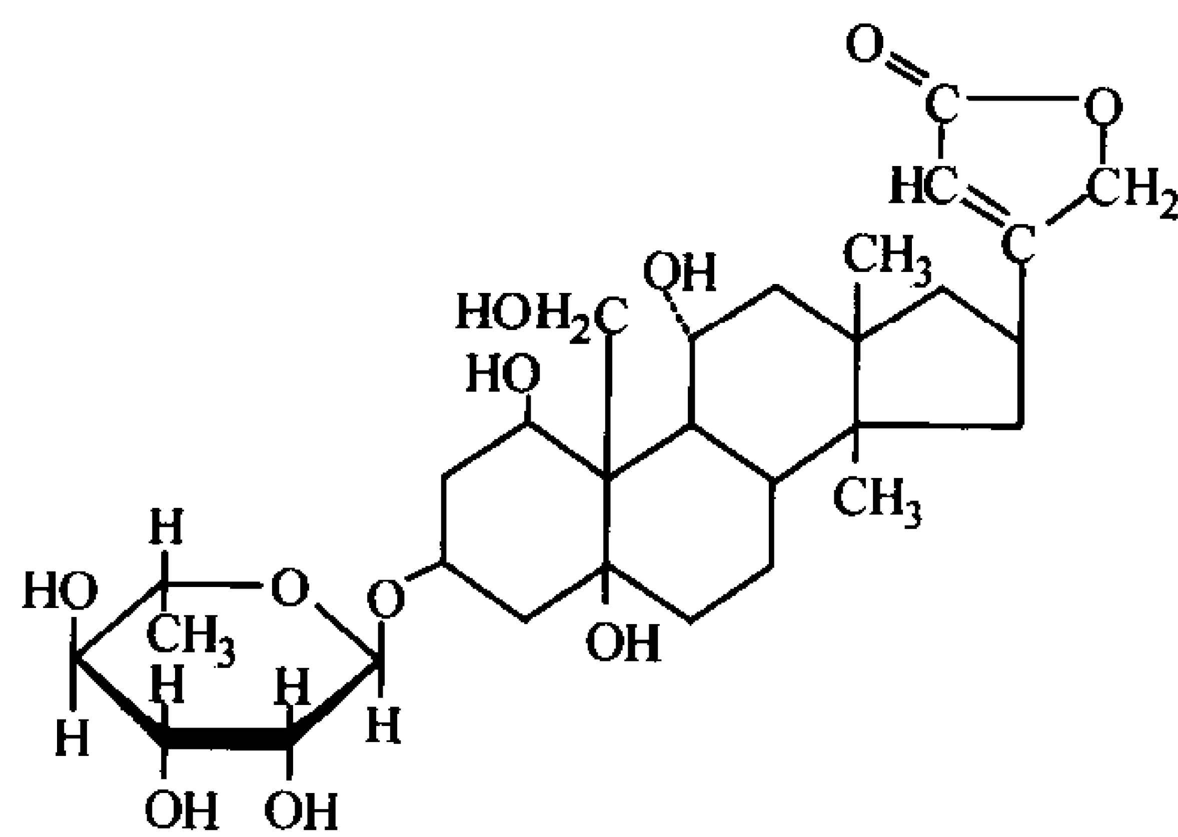
强心苷的作用

强心苷是增强心肌收缩强度的天然产物。实际上，**毛地黄**(digitalis)，紫色毛地黄叶的提取物，是含强心苷的混合物，包括**毛地黄毒素**(digitoxin)[毛地黄苷(digitalin)；见下图]，已用于治疗充血性心力衰竭达几个世纪。强心乌本苷(ouabain，发音为 wabane)，东非乌本树的一种产物，长期以来作为箭毒使用。

这两个类固醇，依然是最常用的强心处方药物，通过和蛋白质的外露部分牢固结合，抑制(Na^+-K^+)-ATP 酶(图 10-37)，阻断图 10-38 中的第 5 步。结果细胞内 Na^+ 浓度的增加刺激心脏(Na^+-Ca^{2+})-ATP 酶的反向转运系统，将 Na^+ 泵出，而将 Ca^{2+} 泵入细胞。胞浆 Ca^{2+} 浓度的增加使肌浆网中的 Ca^{2+} 浓度急增。Ca^{2+} 的释放又激发肌肉的收缩(节 7-3C)，使胞浆中 Ca^{2+} 浓度的增加远大于正常，从而强化心肌收缩的力量。乌本苷曾经一度被认为仅为植物所产生，最近发现它是一种由肾皮质分泌的动物激素，其功能是调节细胞中的 Na^+ 浓度和机体总的盐水平衡。



毛地黄毒素（毛地黄苷）



乌本苷

胃黏膜的(H^+-K^+)-ATP 酶

哺乳动物胃壁(胃黏膜)中的细胞分泌 HCl 可达 0.15mol/L(pH0.8)，因为这些细胞的胞浆 pH 是 7.4，这说明 pH 差异超过 6.0 单位，这是已知真核细胞中最大的一个差异值。分泌的质子来自细胞内碳酸酐酶对 CO_2 的水化作用：



$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

H^+ 的分泌涉及到(**H^+-K^+)-ATP** 酶，其结构和性质类似于(Na^+-K^+)-ATP 酶的反向转运。在这里，当 H^+ 被泵出时 K^+ 进入细胞，随后 H^+ 和 Cl^- 被共同转运外出，因此，HCl 是总的转运产物。HCl 的过量产生会损害胃黏膜(见框 10-4)。

框 10-4　健康和疾病的生物化学

HCl 和胃溃疡

胃的极酸条件是消化过程必需的一个部分：低 pH 杀死食入的微生物，使蛋白质变性并激活蛋白水解酶——**胃蛋白酶**(pepsin)，该酶的最适 pH 约为 2.0。胃蛋白酶对肽键有很宽的专一性，对水解胶原多肽链特别有效。胃本身依靠一厚层黏液保护自己，这层黏液是水和被称为黏蛋白的高度 *O*-糖基化蛋白质的混合物。如果胃酸触及胃黏膜下面，就会产生胃溃疡。

组胺(histamine)刺激细胞表面受体，从而激活胃黏膜的(H^+-K^+)-ATP 酶，通过和组胺竞争结合受体阻断这一过程的化合物能够减少 HCl 的产生。例如，甲腈咪胺(cimetidine，商品名 Tagamet)和其类似物，它们都和组胺相似，可和组胺受体结合，但不激活(H^+-K^+)-ATP 酶。这类药物广泛用于减轻疼痛或胃溃疡的致命症状。

许多溃疡最终是由新近发现的幽门螺旋菌(*Helicobacter pylori*)(下图)感染所引起，幽门螺旋菌在营养丰富的胃黏液中可旺盛生长。由于该菌或多或少和寄主的抗微生物武器隔绝，它倾向于诱发胃组织慢性炎症，从而使胃组织变得对额外的酸诱发性损害更为敏感。在这种情况下，消除感染的抗生素要比只减轻症状的甲腈咪胺类药物对胃溃疡的治疗更好。(虽然这类药物也广泛用于消除心口灼热的症状，此症状是由胃的内容物倒流进入对酸敏感的食道而引起)。

N—C≡N
‖
H_3C　CH_2—S—CH_2—CH_2—NH—C—NH—CH_3
HN　N

甲腈咪胺

CH_2—CH_2—NH_3^+
HN　N

组胺

[引自 Chris Bjomberg Photo Researchers]

D. 离子梯度驱动的主动运输

诸如(Na^+-K^+)-ATP 酶这样的系统可产生跨膜的电化学梯度，贮藏在电化学梯度中的自由能赋于各种吸能生理过程以动力。例如，肠表皮细胞通过 Na^+ 依赖的同向转运，摄取饮食中的葡萄糖(图 10-40)。这个“爬坡”转运过程最直接能源是 Na^+ 梯度，这个过程是一个继发性主动运输的例子，因为*在这些细胞中维持 Na^+ 梯度靠的是*(Na^+-K^+)-ATP 酶。Na^+-葡萄糖转运系统在细胞内富集葡萄糖，然后经过被动介导性葡萄糖反向转运，将葡萄糖运送进入毛细血管(这个转运蛋白类似红细胞里的转运蛋白；图 10-35)。由于葡萄糖促进 Na^+ 的再吸收，反过来又促进了水的再吸收，所以由于腹泻遭受盐和水损失的个体，常补给葡萄糖。

乳糖通透酶需要质子梯度

大肠杆菌这类革兰氏阴性细菌，具有好几个富集糖的主动运输系统。**乳糖通透酶**(lactose permease)[又称为**半乳糖通透酶**(galactoside permease)]是一个已被广泛研究的系统，它利用质

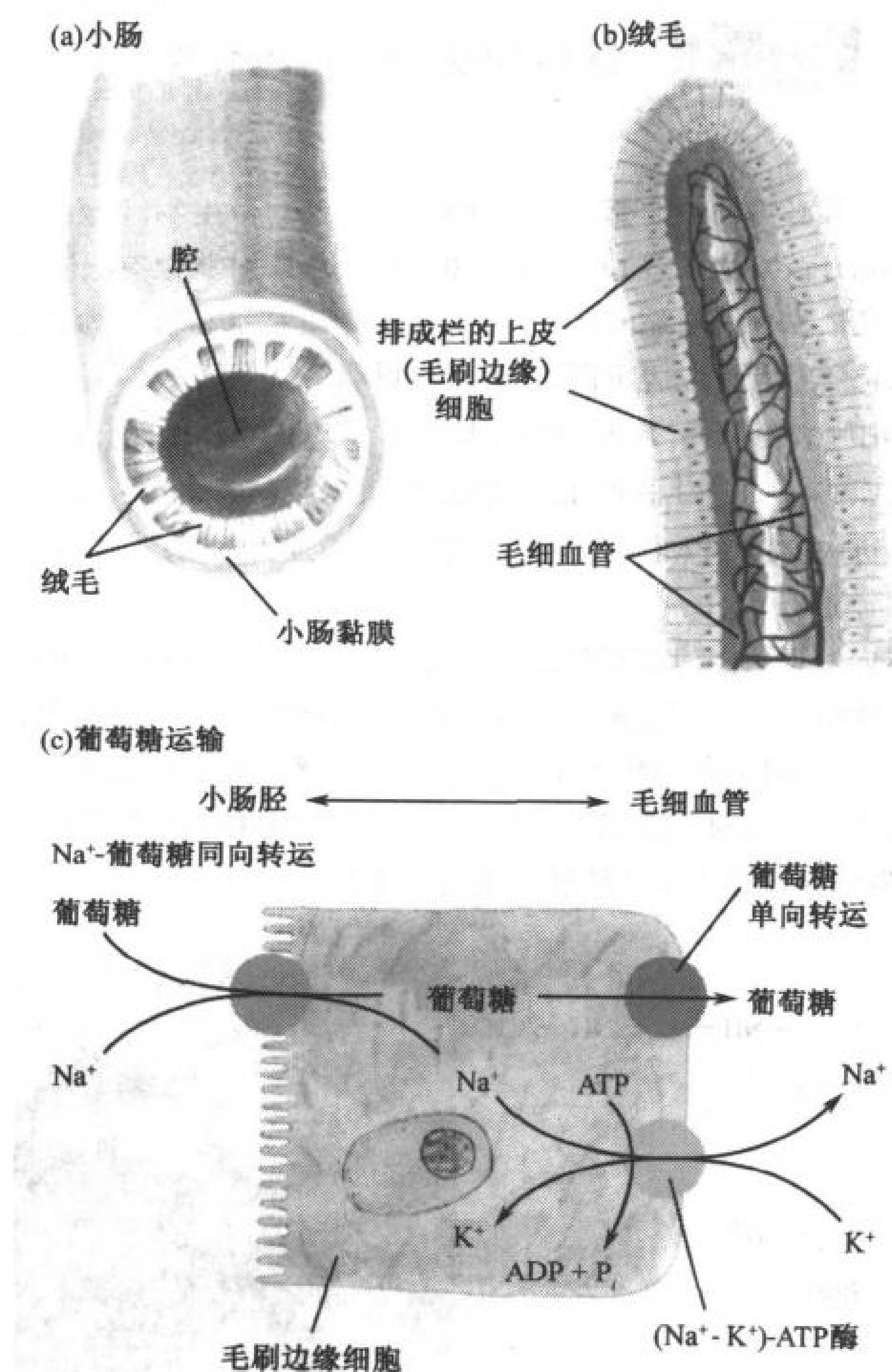


图 10-40 葡萄糖在肠上皮细胞中的运输

毛刷状的绒毛内衬大大增加了小肠的表面积(a),利于营养物的吸收。形成绒毛的毛刷状边缘细胞(b)从小肠腔中富集葡萄糖,同向转运 Na^+(c),这一过程由(Na^+-K^+)-ATP 酶驱动,该酶定位在细胞的毛细血管一侧,起着维持细胞内低 Na^+ 浓度的功能。经过单独的被动介导性单向转运将葡萄糖运输入血流,和红细胞的单向转运系统类似。

子梯度跨细菌细胞膜,协同转运 H^+ 和乳糖(图 10-41)。质子梯度是通过类似线粒体中的氧化代谢方式产生(节 17-2),由这些线粒体系统所产生的电化学势梯度,主要用于驱动 ATP 的合成。

乳糖通透酶和(Na^+-K^+)-ATP 酶相似,是一个具有两种主要构象状态的跨膜蛋白质:

1) E_1 构象,面向细胞内部,有一个低亲和性的乳糖结合中心。

2) E_2 构象,面向细胞外部,有一个高亲和性的乳糖结合中心。

只有当它们的 H^+ 和乳糖结合中心占满或空缺时,E_1 和 E_2 构象才能相互转换。这样就避免了没有乳糖进入细胞协同转运的 H^+ 梯度消耗,同样也防止了乳糖转运出细胞,因为这需要协同转运 H^+ 来对抗乳糖浓度梯度。

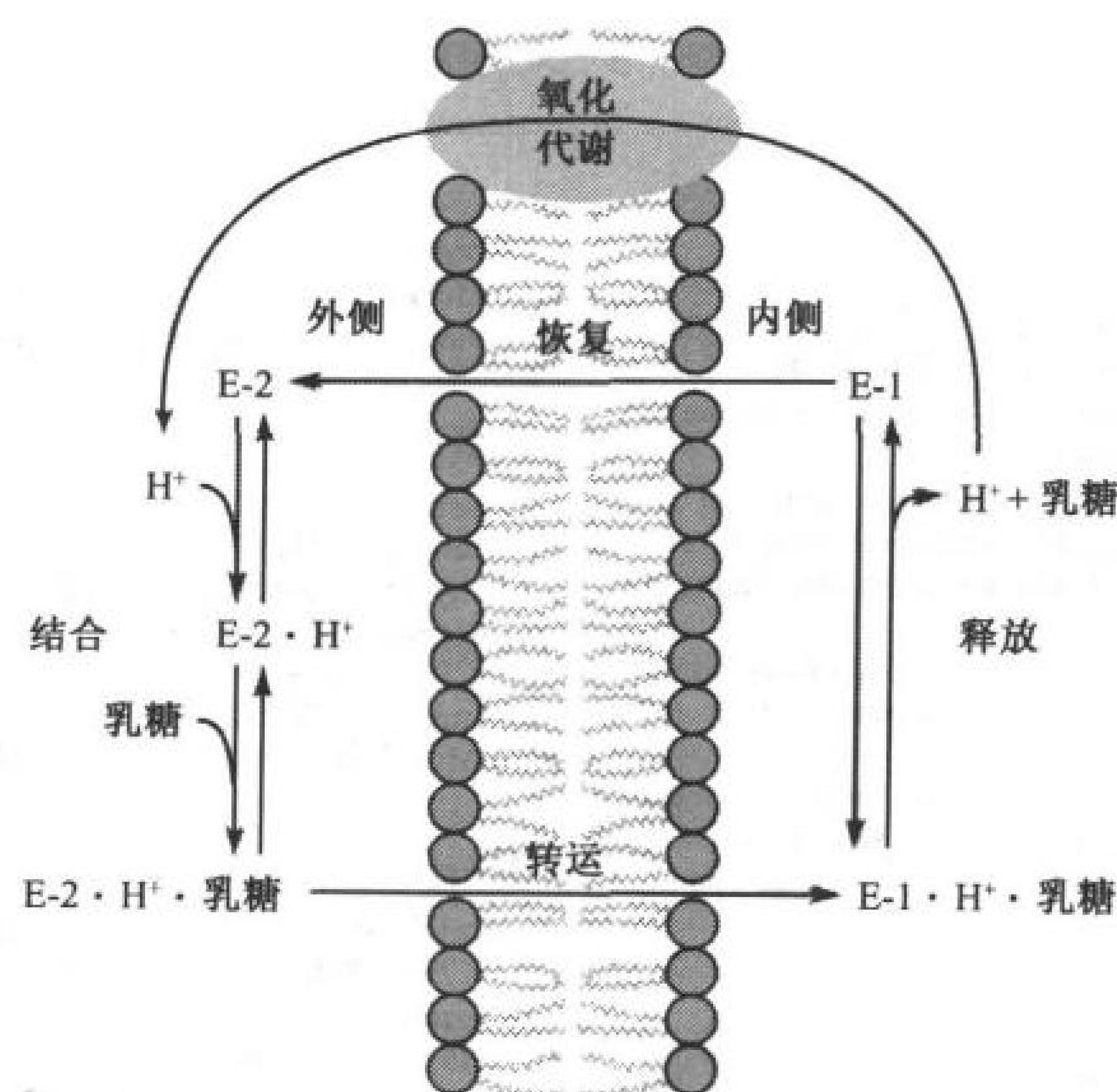


图 10-41 大肠杆菌乳糖通透酶协同转运 H^+ 和乳糖的示意图

H^+ 首先和细胞外侧的 E_2 结合，接着和乳糖结合，在细胞内侧 H^+ 和乳糖从 E_1 释放出来，E_2 必须既和乳糖结合又和 H^+ 结合后才能使其构象变成 E_1，从而协同转运乳糖和 H^+ 进入细胞。当 E_1 不与乳糖和 H^+ 结合时，就转变为 E_2 构象，由此完成转运循环。

小　结

1. 生物膜的蛋白质，包括膜内在蛋白，都具有一个或多个跨膜 α 螺旋或 β-桶结构。在所有例子中，暴露于膜表面的蛋白质都是疏水的。
2. 其他膜结合蛋白，通过类异戊二烯、脂肪酸或糖基化磷脂酰肌醇基团固定在膜上。外周蛋白和膜表面只是松散的结合。
3. 膜结构的流动镶嵌模型，解释了膜蛋白和脂类的侧向扩散。
4. 膜蛋白的排列可能取决于它们和下层蛋白骨架的相互作用，如同红血球那样。
5. 脂在内质网膜的胞质面合成，通过翻转酶和磷脂移位酶分布在小叶间。
6. 跨膜蛋白、分泌蛋白和溶酶体蛋白的合成始于 RER(粗糙内质网)。按照信号假说，信号肽指引新生的多肽通过内质网膜，包被小泡将镶嵌在膜中的蛋白质和腔内的蛋白质从内质网转运到高尔基体中加工，再从高尔基体转运到其他膜。
7. 脂蛋白在体内转运脂，它是非极性脂的复合物，被一层两性脂和载脂蛋白包围。
8. 由 LDL 转运的胆固醇，通过受体介导的 LDL 内吞作用被摄入细胞。
9. 物质的介导性和非介导性跨膜转运，由膜两侧的化学势差驱动。
10. 被动介导性运输包括离子载体、膜孔蛋白和某些转运蛋白，这些转运蛋白在两种构象间转换，从而在膜的相反两侧暴露出配体结合位点。
11. 主动运输在多数情况下是由 ATP 水解驱动的。在(Na^+-K^+)-ATP 酶和其他的离子转运蛋白中，ATP 水解和离子运输是偶联的，并具有方向性。
12. 在次级主动运输中，由 ATP 酶维持的离子梯度驱动别的物质转运。

参考文献

膜的结构和膜蛋白

Edidin, M., Patches, posts and fences: proteins and plasma membrane domains, *Trends Cell Biol.* **2,** 376–380 (1992).

Luna, E.J. and Hitt, A.I., Cytoskeleton–plasma membrane interactions, *Science* **258,** 955–964 (1992).

Petty, H.R., *Molecular Biology of Membranes. Structure and Function,* Plenum Press (1993). [Summarizes the structures of membrane proteins and lipids and describes the biological functions of membranes.]

Udenfriend, S. and Kodukula, K., How glycosyl-phosphatidylinositol-anchored membrane proteins are made, *Annu. Rev. Biochem.* **64,** 563–591 (1995).

Zhang, F.L. and Casey, P.J., Protein prenylation: molecular mechanism and functional consequences, *Annu. Rev. Biochem.* **65,** 241–269 (1996).

膜组装和靶向

Devaux, P.E., Protein involvement in transmembrane lipid asymmetry, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21,** 417–439 (1992).

Schatz, G. and Dobberstein, B., Common principles of protein translocation across membranes, *Science* **271,** 1519–1526 (1996).

Südhof, T.C., The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein–protein interactions, *Nature* **375,** 645–653 (1995). [Describes membrane fusion, exocytosis, and endocytosis using as an example the cycling of neurotransmitters.]

脂蛋白

Brown, M.S. and Goldstein, J.L., Koch's postulates for cholesterol, *Cell* **71,** 187–188 (1992). [Describes approaches to identifying cholesterol as the cause of atherosclerosis.]

Rosseneu, M. (Ed.), *Structure and Function of Apolipoproteins,* CRC Press (1992).

Schmid, S.L., The mechanism of receptor mediated endocytosis: More questions than answers, *BioEssays* **14,** 589–596 (1992).

转运蛋白

Carafoli, E., The Ca^{2+} pump of the plasma membrane, *J. Biol. Chem.* **267,** 2115–2118 (1992).

Lingrel, J.B. and Kuntzweiler, T., Na^+,K^+-ATPase, *J. Biol. Chem.* **269,** 19659–19662 (1994).

Nikaido, H., Porins and specific diffusion channels in bacterial outer membranes, *J. Biol. Chem.* **269,** 3905–3908 (1994).

Silverman, M., Structure and function of hexose transporters, *Annu. Rev. Biochem.* **60,** 757–794 (1991). [Discusses both passive facilitative glucose transporters and the Na^+–glucose symport.]

关 键 词

膜内在蛋白　integral(intrinsic)protein
流动镶嵌模型　fluid mosaic model
信号肽　signal peptide
被动介导性运输　passive-mediated transport
跨膜蛋白　transmembrane protein
荧光光漂白恢复　fluorescence photobleaching recovery
包被小泡　coated vesicle
离子载体　ionophore
异戊烯化　prenylation
细胞骨架　cyto skeleton
脂蛋白　lipoprotein
单向转运　uniport
豆蔻酰化　myristoylation
门栏模型　gates and fences model
转运蛋白　transport protein
同向转运　symport
棕榈酰化　palmitoylation
环状脂　annular lipid
化学势差　chemical potential difference
反向转运　antiport
GPI 连接蛋白　GPI-linked protein
翻转酶　flipase
电位势差　electrical potential difference
初级主动运输　primary active transport
外周(外在)蛋白　peripheral(extrinsic)protein
磷脂移位酶　phosphotipid translocase
$\Delta\psi$
次级主动运输　secondary active transport
冰冻断裂-冰冻蚀刻电子显微镜　freeze-fracture electron microscopy
信号假说　signal hypothesis
非介导性运输　nonmediated transport
介导性运输　mediated transport

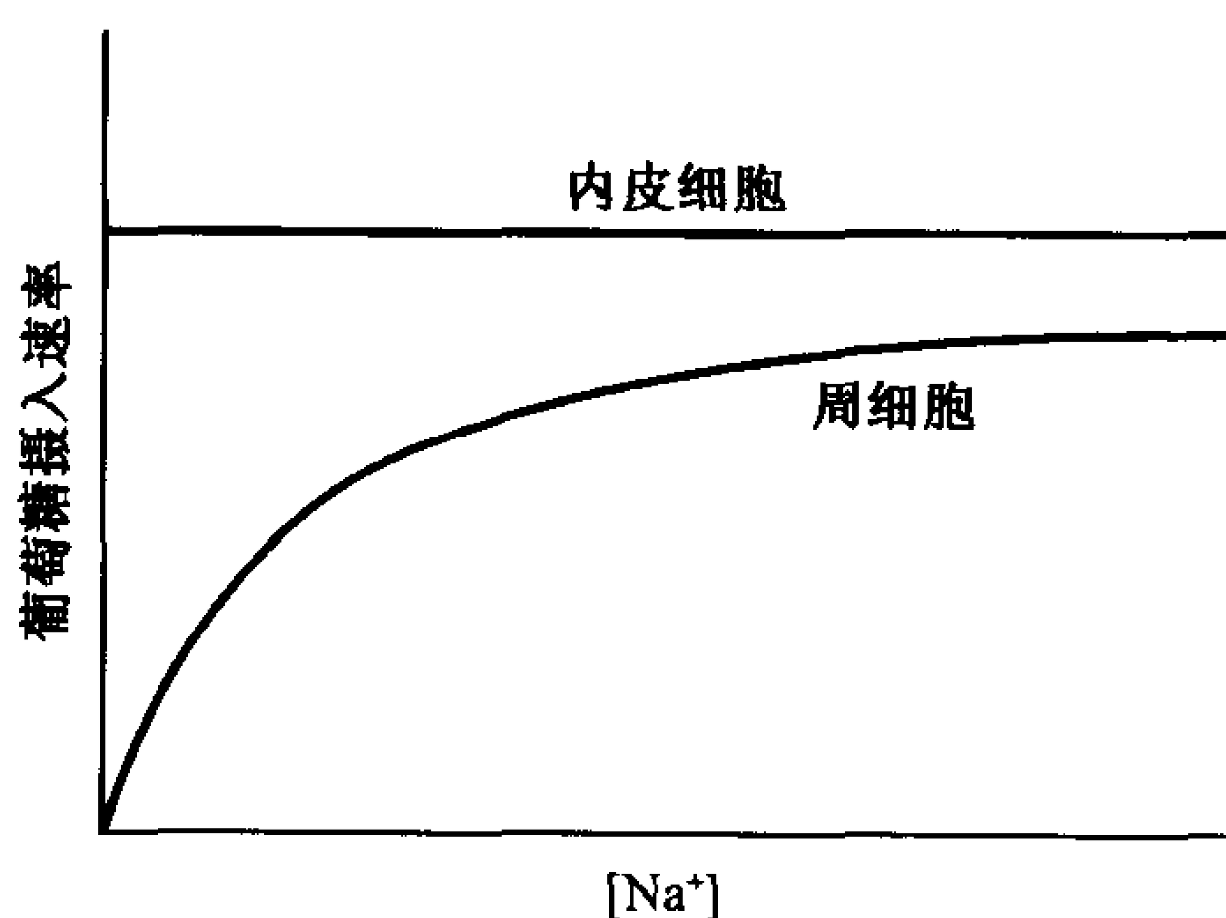
学习思考题

1. 解释膜内在蛋白和膜外周蛋白之间的差别。

2. 描述脂连接蛋白的共价修饰。
3. 描述流动镶嵌模型。
4. 细胞骨架如何影响膜蛋白的分布?
5. 描述溶酶体蛋白的膜转位。
6. 从它在核糖体中合成开始,跟踪一个细胞表面糖蛋白的路径。
7. 描述 LDL 如何转运胆固醇并为细胞所吸收。
8. 解释介导性运输和非介导性运输在跨膜之间的差别。
9. 离子载体、膜孔蛋白和被动介导性运输蛋白之间有哪些相似点和差别?
10. 区分被动介导性运输、主动运输和次级主动运输。

练 习 题

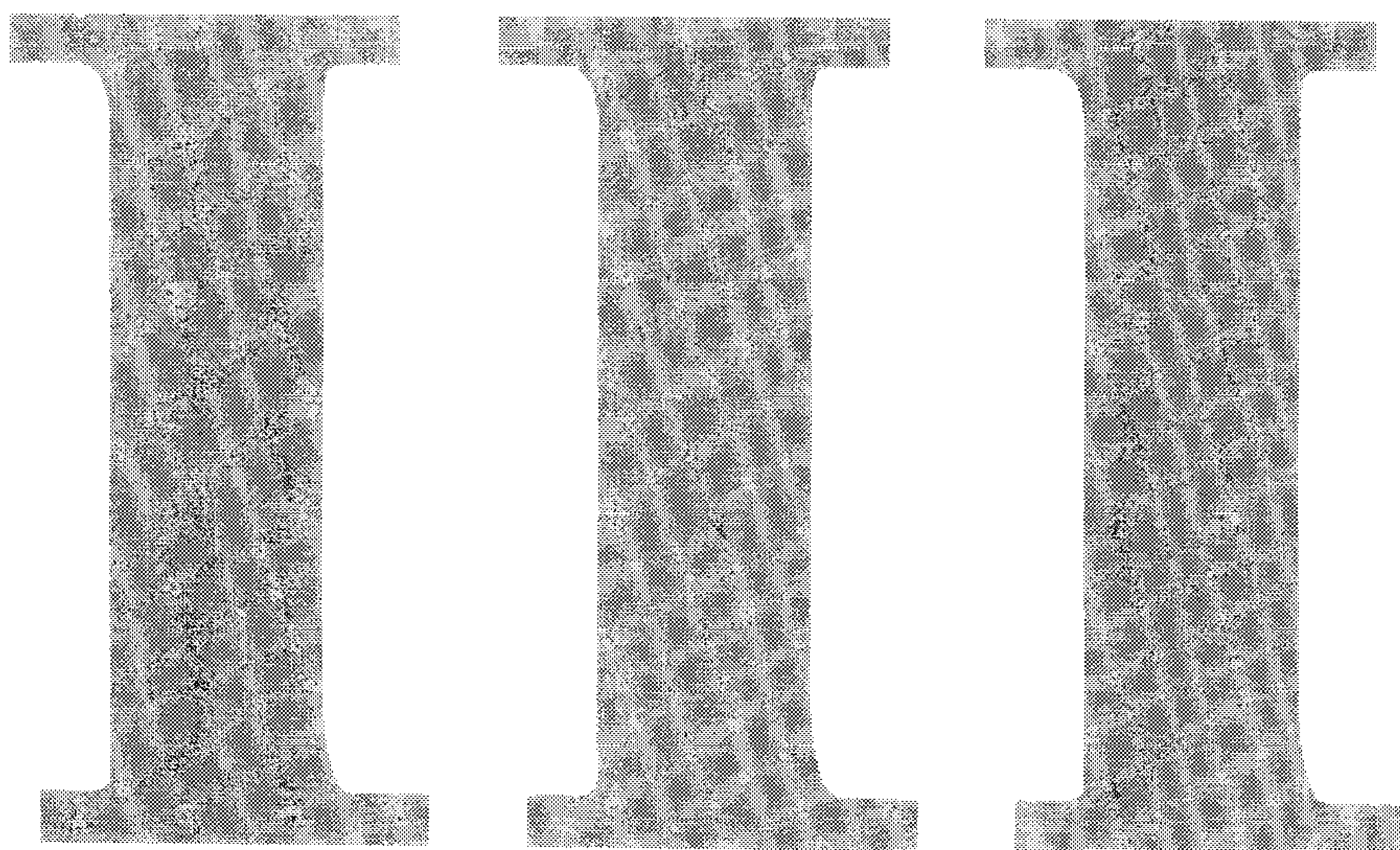
1. (a)跨越脂双层(约 30Å)需要多少圈 α 螺旋?
   (b)所需的最小残基数是多少?
   (c)为什么大多数跨膜螺旋含有的残基数大于最小残基数?
2. β 折叠的 C_α 原子间的距离是约 3.5Å,具有 β 构象的单个 9 残基片段可否作为膜内在蛋白的跨膜部分?
3. 下述脂样品是否符合真核细胞原生质膜内层或外层小叶? (a)20%磷脂酰胆碱、15%磷脂酰丝氨酸、65%其他脂。(b)35%磷脂酰胆碱、15%神经节苷脂、5%胆固醇、45%其他脂。
4. 描述血型糖蛋白 A 的标记模式,当一种不能透过膜的标记蛋白试剂加入:(a)可溶性红细胞蛋白制剂中;(b)完整的红细胞的血影细胞中;(c)最初渗漏,然后立即被封住并转入不含标记试剂的红细胞的血影细胞中。
5. 预测信号肽酶突变的影响,这一突变使其专一性变窄,限制在只能在 2 个 Leu 残基之间切开。
6. 指出下列化合物是否可以通过非介导性运输或介导性运输跨膜:(a)乙醇,(b)甘氨酸,(c)胆固醇,(d)ATP。
7. 当细胞内$[Na^+]$=10mmol/L,细胞外$[Na^+]$=150mmol/L,温度为 37℃ 时(a)计算细胞内外之间的化学势差;(b)当膜电位为 -60mV,电化学势是多少?(细胞内是负值)
8. (a)当膜被冷却到低于它的转换温度时,缬氨霉素转运 Na^+ 会发生什么情况? (b)短杆菌肽 A 的 N 端是被甲酰化的(图 10-32a),如果它 N 端未被甲酰化这种形式阻断,短杆菌肽是否形成跨膜通道?
9. 100 个缬氨霉素分子转运足够量的 K^+,使体积为 100μm^3 的红细胞内 K^+ 浓度改变 10mmol/L 需要多长时间?(假定缬氨霉素不将任何 K^+ 转运出细胞,实际上它将 K^+ 运出细胞,并且在细胞内总是被 K^+ 所饱和)。
10. 如果如图 10-40c 所示,细胞中 ATP 的供给突然消失,细胞内的葡萄糖浓度是增加、减少还是保持不变?
11. 内皮细胞和眼睛视网膜的周细胞对葡萄糖的摄入机制不同,右图表明在钠离子浓度增加情况下每种细胞的葡萄糖吸收速率,这些结果对在每种细胞中的葡萄糖转运蛋白揭示了什么?(该题由 Kathleen Cornely, providence College 提供)



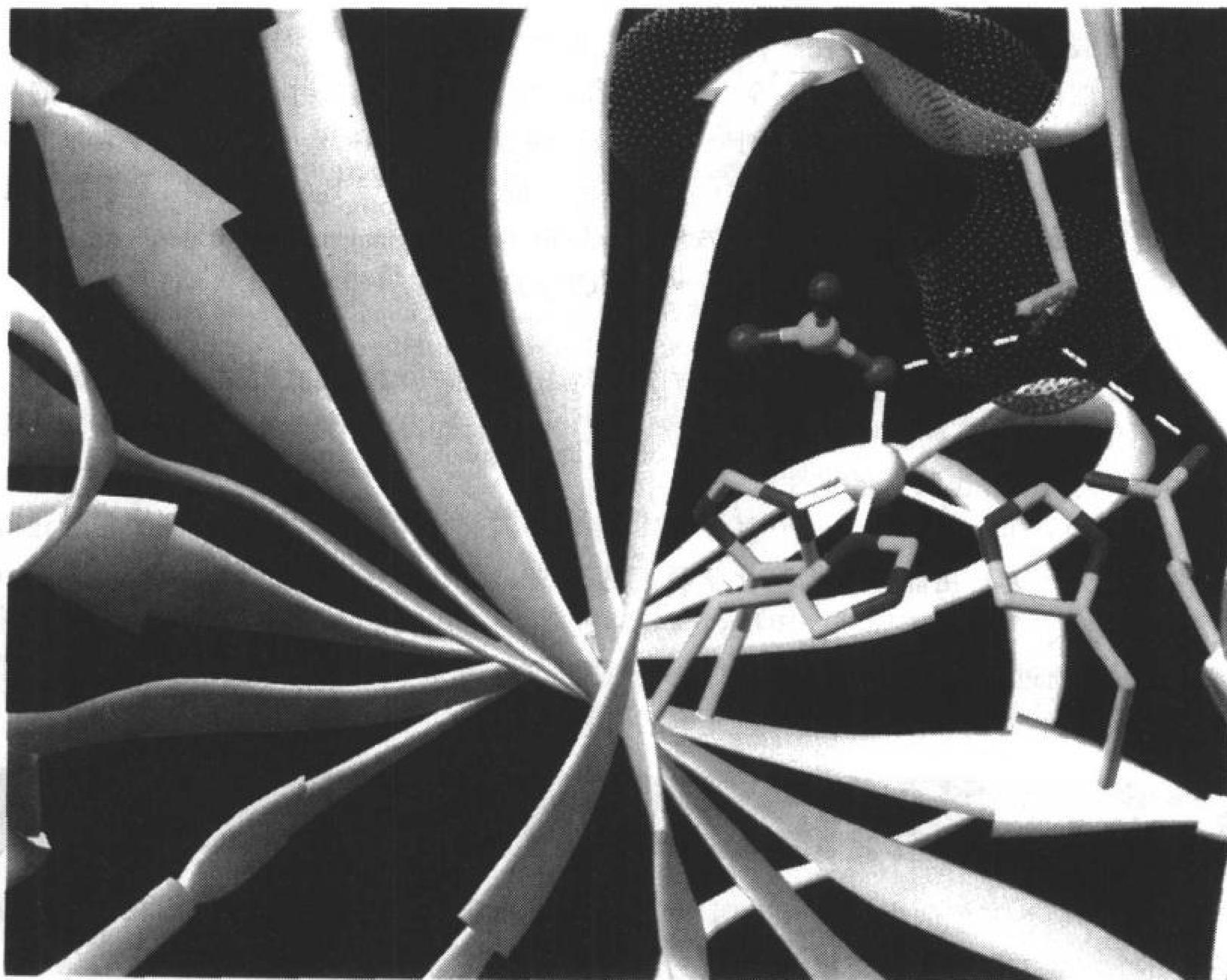
12. 乳酸转运进鼠肝细胞取决于细胞外的 pH 值,pH5 时转运迅速,pH8 时转运缓慢。氢离子对这些细胞中的乳酸转运起什么作用? 有几种可能性。(该题由 Kathleen Cornely, providence College 提供)

(南京大学 张洪祖 译)

第三篇　酶



第11章 酶 催 化



碳酸酐酶的活性中心包括三个与 Zn^{2+} 离子(青色球体)配位的组氨酸残基，HCO_3^- 底物成为 Zn^{2+} 离子的第四个配体，通过范德华力及与几个侧链一起组成的氢键网与酶相互作用。碳酸酐酶以及其他酶的活性中心的功能基团是如何排列以至于它们能促进特定底物转变成特定产物，是什么力促进这样的反应？(由印度的 Bhabha 原子研究中心的 K. K. Kannan 教授提供 X 射线结构图)

1. 酶的基本性质
   A. 酶的命名
   B. 底物专一性
   C. 辅基和辅酶
2. 活化能和反应坐标
3. 催化机理
   A. 酸碱催化
   B. 共价催化
   C. 金属离子催化
   D. 静电催化
   E. 通过邻近和定向效应催化
   F. 通过优先过渡态结合的催化
4. 溶菌酶
   A. 酶的结构
   B. 催化机理
5. 丝氨酸蛋白酶

A. 活性中心　　　　C. 催化机理
B. X 射线结构　　　D. 酶原

282 生命系统中存在大量各种各样的生化反应,几乎每一种反应都有称之为酶的生物催化剂介导。**酶学**(enzymology),即酶的研究,在生物化学发展早期就开始了;它们都是从 19 世纪对发酵和消化的研究演化而来的。起初,因无法在实验室中重复大部分的生物化学反应,Louis Pasteur 及其他一些人假定生命系统中存在一种"生命力",这种"生命力"可不受支配无生命物质的自然法则的约束。然而,Justus von Liebig 等一些研究者认为生物过程是由当时称之为"酵素"的化学物质作用引起的。实际上,在 1878 年创造"enzyme"(希腊语;en, in + zyme, 即酵母)是为了强调酵母中有某种物质而不是酵母本身催化了发酵反应。最后,Eduard Buchner 证明无细胞的酵母抽提液就能完成葡萄糖到醇的合成[**乙醇发酵**(alcoholic fermentation);节 14-3B]:



$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2CH_3CH_2OH + 2CO_2$$

此化学转化实际上有 11 步酶催化反应。

直到 1926 年,James Sumner 结晶了刀豆**脲酶**(urease)(该酶催化尿素水解为 NH_3 和 CO_2)才确定了酶的化学组成,证明这些结晶由蛋白质组成。从那时起,从酶学上充分证明了大部分酶是蛋白(注意,一些 RNA 也具有催化性质;节 23-2E)。

本章关注的是生物化学中的一个中心问题:酶是如何起作用的?我们将发现酶是通过降低反应物和产物之间的自由能垒来提高化学反应速度的。通过依赖于酶的**活性中心**(active site)(行使催化功能的区域)的不同功能团排列的各种机理,酶完成其催化任务。在本章中,我们将介绍这些机理,并通过一些例子阐明酶是如何以多种机理联合来催化生物反应的。在后续章节中还包括酶动力学的讨论和发生这些反应速率的研究。

1. 酶的基本性质

从 Pasteur 时代开始的生化研究表明:尽管酶仍然服从支配其他物质行为的相同的自然规律,酶在几个重要方面与一般的化学催化剂有着明显不同:

1) **更高的反应速率。**酶催化下的反应速率通常比没有催化反应时高出 $10^6 \sim 10^{12}$ 倍(表 11-1),比相应的化学催化反应也要高出好几个数量级。

2) **更温和的反应环境。**酶催化反应的反应条件相对温和:反应温度低于 100℃、常压、近中性 pH 值。与之相比,有效的化学催化剂常常在高温、高压以及极端的 pH 值下进行。

283 3) **更高的反应专一性。**酶远比化学催化剂具有更好的识别反应底物(反应物)和产物的专一性;也就是说,酶催化反应几乎没有副反应产物。

4) **调节能力。**许多酶催化活性还取决于非底物的物质的浓度,而不是底物的浓度。这些调节过程的机理包括别构调节、酶的共价修饰、合成酶数量的变化。

表 11-1　一些酶的催化能力

酶	非酶催化反应速率/s^{-1}	酶反应速率/s^{-1}	速率的提高
碳酸酐酶	1.3×10^{-1}	1×10^{6}	7.7×10^{6}
分支酸变位酶	2.6×10^{-5}	50	1.9×10^{6}
丙糖磷酸酯异构酶	4.3×10^{-6}	4300	1.0×10^{9}
羧肽酶 A	3.0×10^{-9}	578	1.9×10^{11}
AMP 核苷酶	1.0×10^{-11}	60	6.0×10^{12}
葡萄球菌核酸酶	1.7×10^{-13}	95	5.6×10^{14}

引自:Radzicka, A. and Wolfenden, R., Science 267, 91(1995)。

A. 酶的命名

在深入探讨酶的专一性质之前,首先要进行酶的命名。通常的方法是在一种酶作用底物的名字后面,或是在描述一种酶催化行为的词后面,加上-ase 后缀来命名某种酶。因此,**脲酶**(urease)催化**尿素**(urea)的水解,**乙醇脱氢酶**(alcohol dehydrogenase)催化乙醇氧化生成相应的醛。因为最初没有酶的系统命名法,这种习惯命名法有时会导致用两个不同的名字来命名同一种酶或用相同的名字命名不同的酶。此外,多种酶,例如**过氧化氢酶**(catalase),参与 H_2O_2 歧化生成 H_2O 和 O_2,它们的名字中并没有提供它们催化功能的信息。为有效地消除这种混乱,并为大量发现的新酶提供一种合理的命名,国际生物化学和分子生物学联合会(IUBMB)采用了一种系统功能分类表和命名法,用来对酶进行分类和命名。

通常以酶催化的化学反应的性质为酶分类和命名的依据。一共有 6 大类酶反应(表 11-2),再进一步分为若干亚类和亚亚类。每种酶都被指定两个名字和一个由 4 部分构成的分类号。酶的替代名称方便日常使用,它常常是酶过去的俗名。当俗名模棱两可时,使用**系统命名法**(systematic name),即在底物的名称后跟一个以-ase 结尾的词,来专指依据其主要基团分类的酶所催化的反应类型。例如,羧肽酶 A 的系统名称是肽基-L-氨基酸水解酶,其分类号为 EC 3.4.17.1("EC"代表酶委员会,数字代表类、亚类、亚亚类以及它在亚亚类中的序号)。对我们来说,酶的俗名就已足够了。酶的系统名称和 EC 分类号可在英特网上查到(http://www.expasy.ch/sprot/enzyme.html)。

284

表 11-2　酶按反应类型分类

分类	催化反应类型
1. 氧化还原酶	氧化-还原反应
2. 转移酶	转移功能基团
3. 水解酶	水解反应
4. 裂解酶	消去基团以形成双键
5. 异构酶	异构化
6. 连接酶	与 ATP 水解偶联以形成键合

B. 底物专一性

底物与其他分子和酶键合的非共价力,在本质上与控制蛋白质本身构象的力相类似(节 6-4A)。二者都包含了范德华力、静电力、氢键和疏水相互作用。通常,酶分子表面上底物结合区

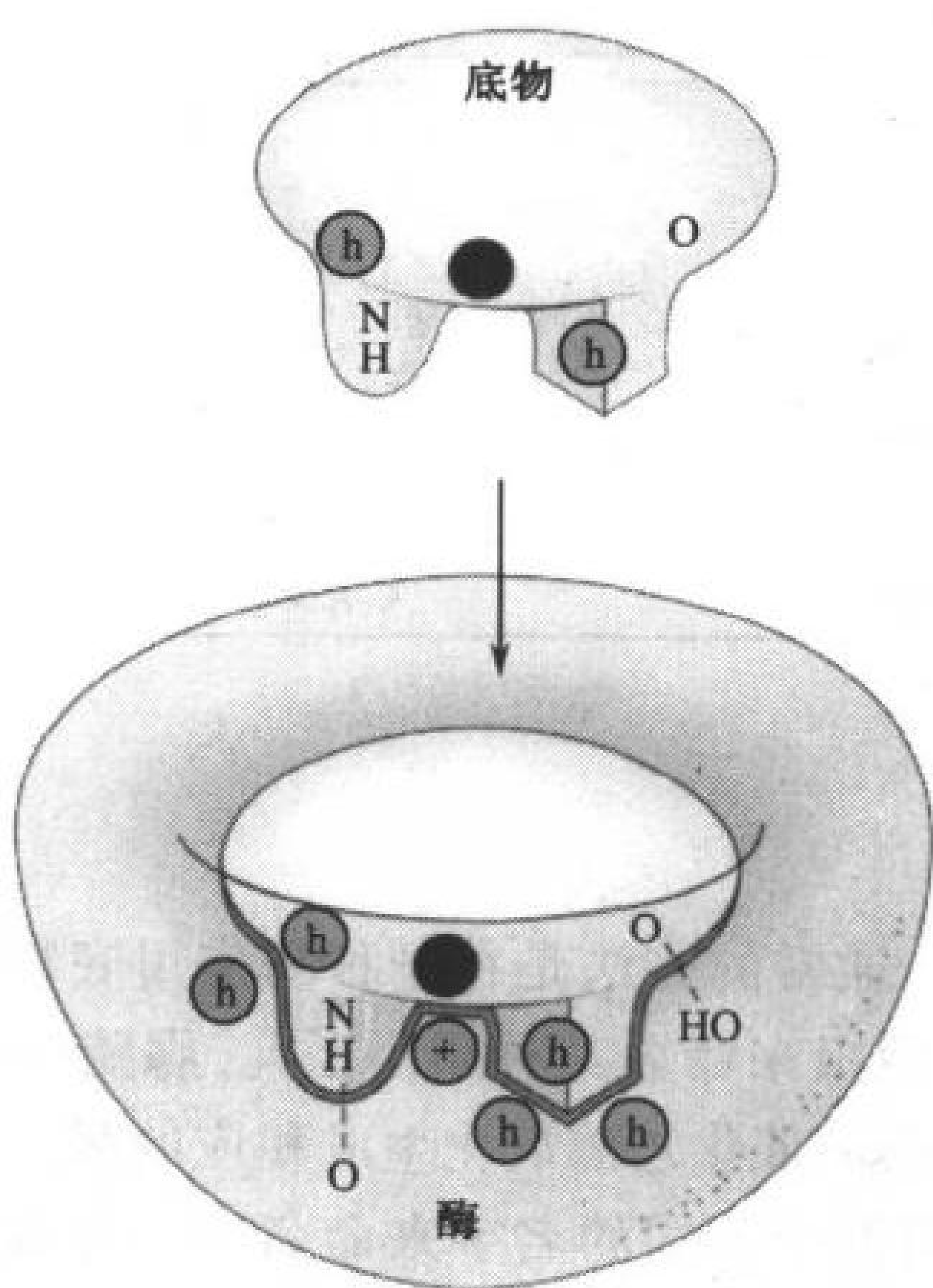


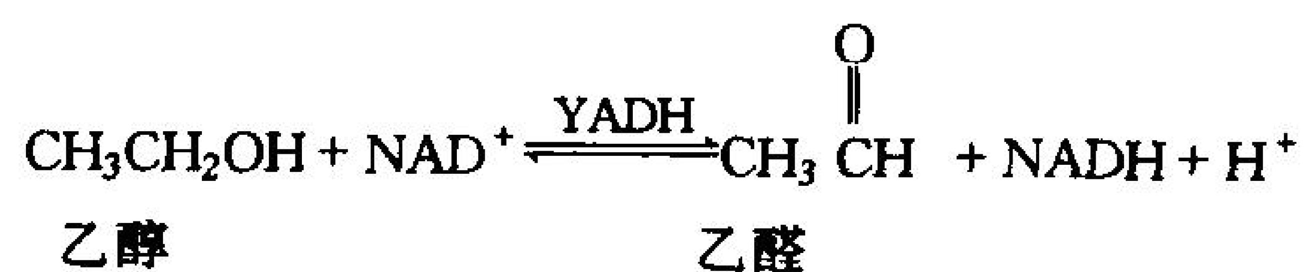
图 11-1　酶-底物复合物

酶和底物之间的几何和物理互补依赖于非共价力，疏水基团用棕色圈中的 h 表示，虚线代表氢键。

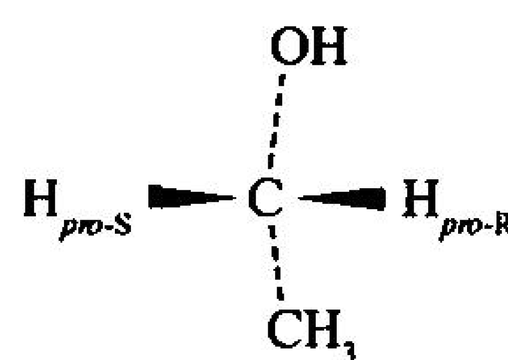
有一个缺口或裂缝，正好与底物的形状互补[**几何互补**(geometric complementarity)]。此外，构成结合区的氨基酸残基排布成与底物吸引[**电性互补**(electronic complementarity)](图 11-1)的专一作用方式。与底物形状或功能团分布不同的分子不能有效地与酶结合。X 射线研究证明大多数酶的底物结合区在底物键合时会有一些构型改变[称为**诱导楔合**(induced fit)]。酶和其底物之间的互补性是锁钥模型的基础，该模型由 Emil Fischer 于 1894 年首次提出。我们即将看到，这种专一的结合对于有效的催化是必要而非充分的。

酶的立体专一性

在结合手性底物及催化其反应时酶都具有高度专一性。这种**立体专一性**(stereospecificity)是由于酶因其自身固有的手性(蛋白质只含 L-氨基酸)形成非对称的活性区的缘故。例如，**酵母乙醇脱氢酶**(YADH)催化乙醇和乙醛的转化：

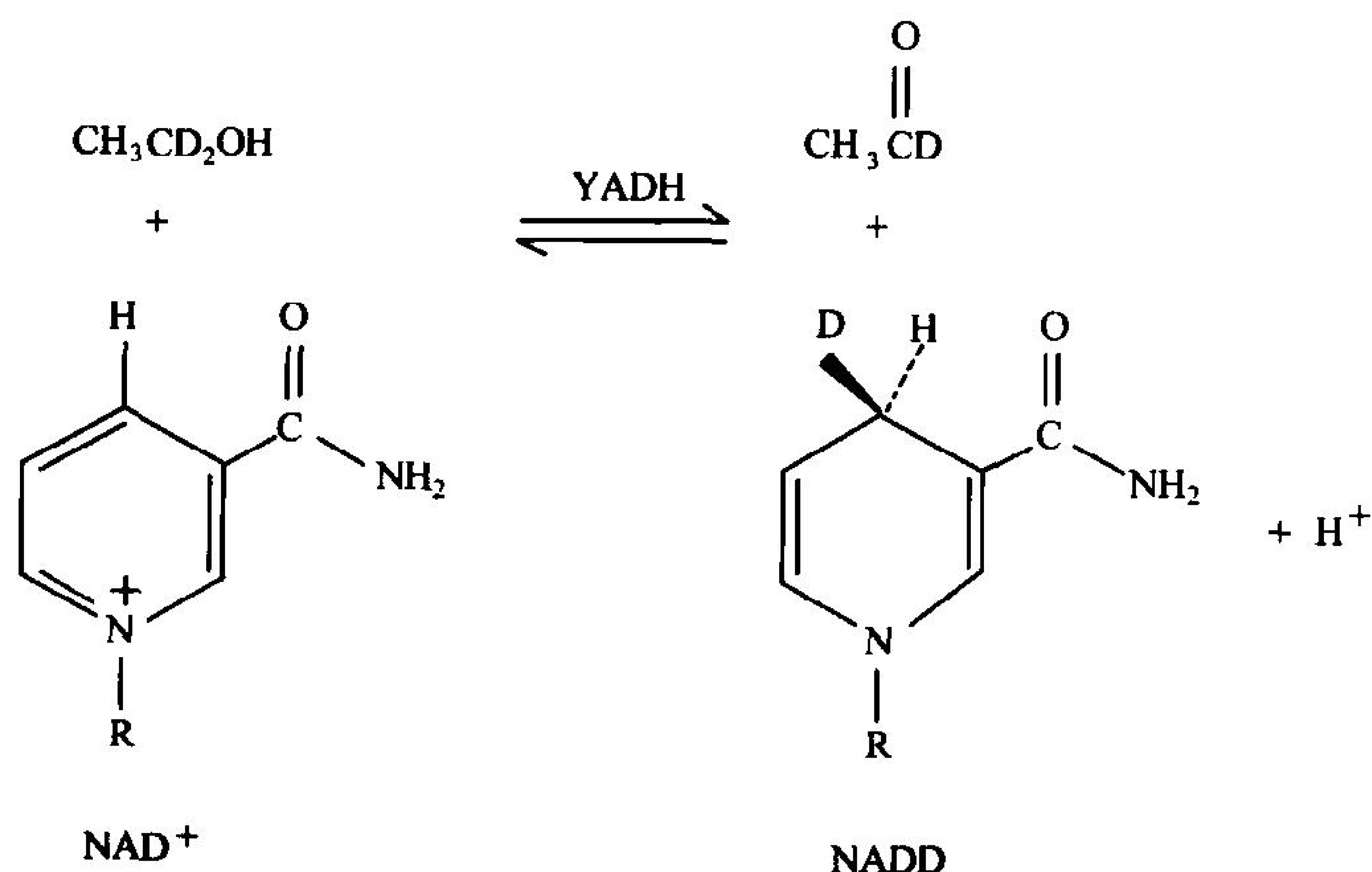


在此反应中，NAD^+ 的尼克酰胺环被还原，生成 NADH。乙醇是**前手性**(prochiral)分子，也就是说，当它的亚甲基上的一个氢[这类原子根据它们在 RS 系统(框 4-1)中的构象被标记为“*pro*-R”或“*pro*-S”]被取代时，它将变为手性分子。乙醇亚甲基上的氢原子在化学上是等价的，但相对于亚甲基碳上的取代基 CH_3 和 OH 来说，它们占据着不同的位置，因此可以被酶活性区区分开。



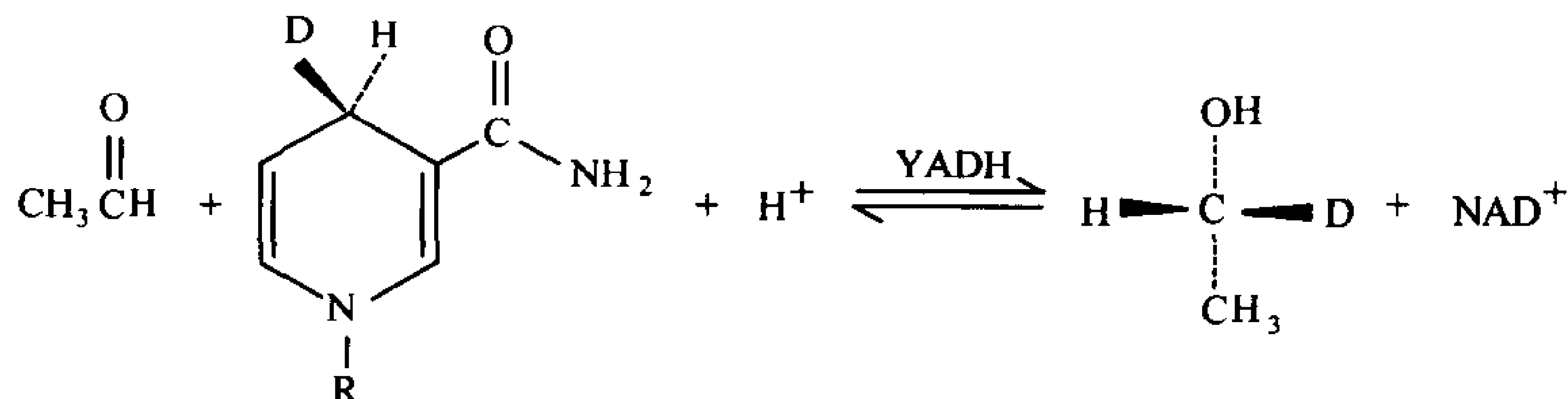
由 Frank Westheimer 和 Birgit Vennesland 所做的系列实验很好地证实了 YADH 的立体专一性：

1）如果 YADH 反应在氘代的乙醇中进行，则 NAD^+ 被氘化生成 NADD：

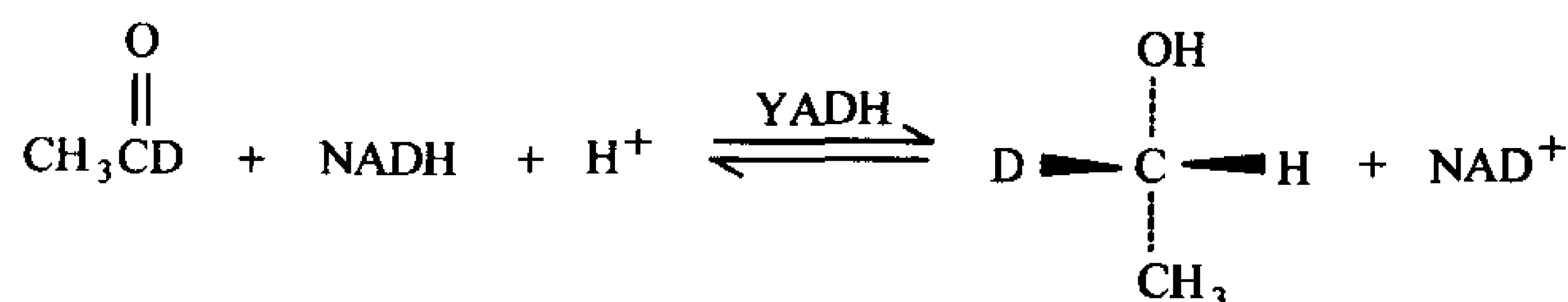


注意 NAD^+ 的尼克酰胺环也是前手性的。

2) 将 NADD 分离，并将 NADD 放在还原正常乙醛的逆反应中，从 NADD 中氘被定量地转移到乙醛以生成产物乙醇。



3) 若前述的 CH_3CHDOH 的对映体通过如下反应制得：



在逆反应中氘不会由产物乙醇转移到 NAD^+ 上。

这说明 YADH 能区别乙醇中的 *pro*-R 氢原子和 *pro*-S 氢原子，并且只转移 *pro*-R 氢原子。YADH 的这种立体专一性决不是特殊的，在考察生化反应时，我们会发现几乎所有参与手性反应的酶都具有绝对立体专一性。

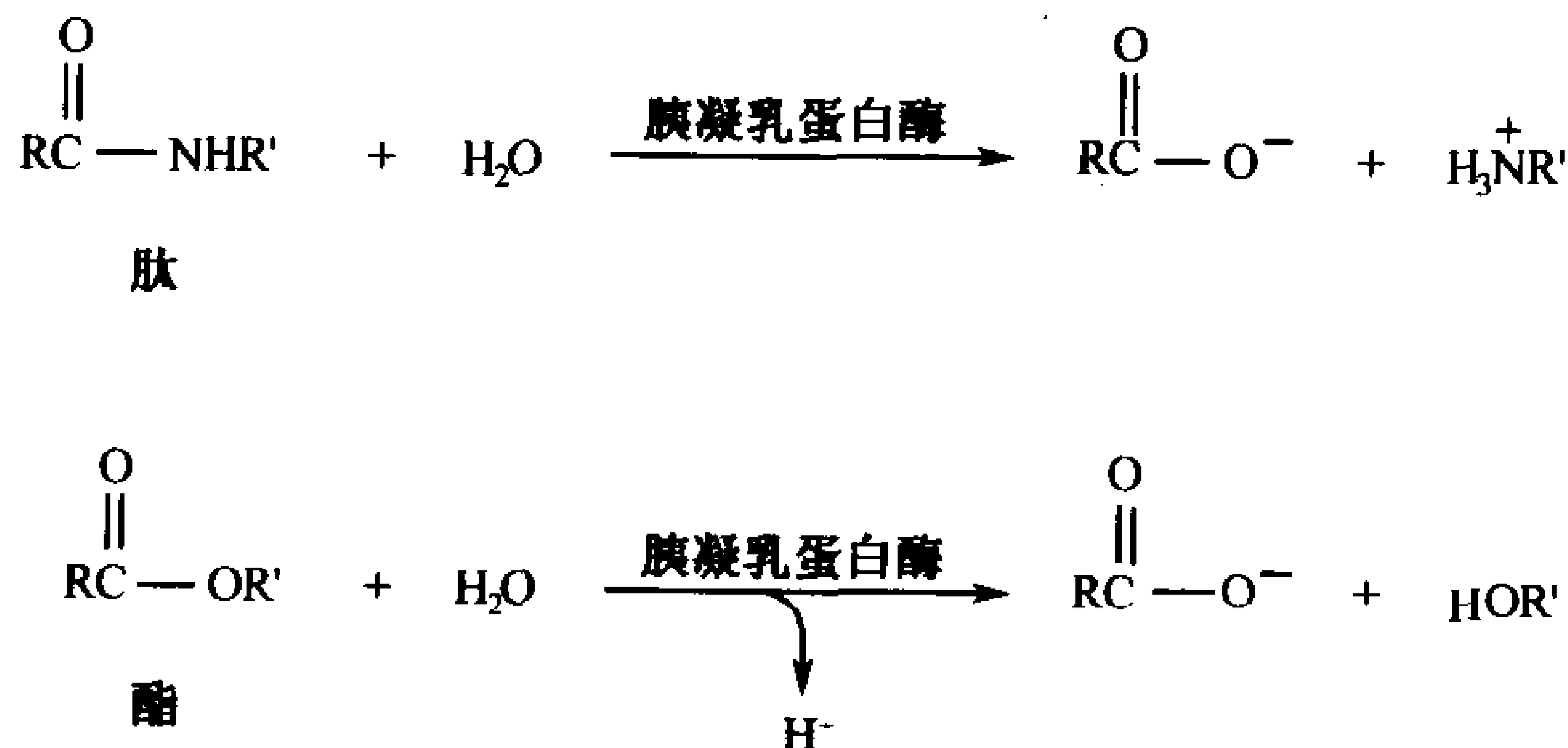
酶在几何专一性中的变化

考虑到酶的结合区与其底物的互补性，酶的立体专一性并不特别让人感到吃惊。具有错误手性的物质不能与酶的结合区进行很好地结合，正如你的右手不能戴你的左手手套一样。除了它们的立体专一性外，大多数酶对它们底物上的化学基团的性质具有很高的选择性。事实上，这种**几何专一性**(geometric specificity)比立体专一性的要求更严格。

286

酶在几何专一性的程度上差别非常大，一些酶仅对一种化合物有催化活性。大部分酶可以催化一系列相似物质的反应，例如，YADH 可催化几种伯醇或仲醇的氧化反应，但对乙醇却不太有效。$NADP^+$ 与 NAD^+ 的区别仅在于在核糖腺苷的 2′位多了一个磷酰基，这就使得 $NADP^+$ 不能与 YADH 结合。另一方面，许多酶可和 $NADP^+$ 结合，而不能和 NAD^+ 结合。

有一些酶，尤其是消化酶，可以和更多的底物作用，因此用几何特异性作为优先选择更能精确地来描述。有一些酶，在它们所能催化的反应类型上甚至也不具有特异性，例如胰凝乳蛋白酶，除了介导肽键水解外，还可以催化酯键的水解。



这种特性使得我们在用分子质量较小的合成酯做底物来测量胰凝乳蛋白酶的活性时会很方便，这样的可选择性比规则规定的要多得多。的确，大多数细胞内的酶在体内的功能是对一个特定底物催化特定的反应。

C. 辅基和辅酶

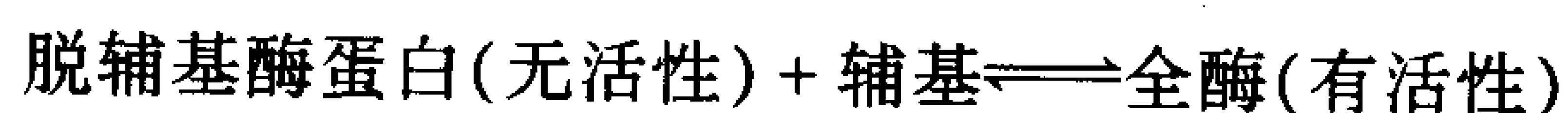
如我们所知，蛋白质的官能团可以容易地参加酸碱反应，形成一定类型的瞬时共价键，并且参与电荷-电荷相互作用。然而，它们不适用于催化氧化-还原反应以及许多官能团转移反应。酶只有在有小分子**辅因子**(cofactor)存在时才可以催化这些反应，这些辅基在本质上起着酶的"化学齿(chemical teeth)"的作用。

辅基可以是金属离子，例如 Cu^{2+}、Fe^{3+} 或 Zn^{2+} 等。这些辅基的基本性质解释了为什么机体要求在所吃的食物中需要痕量的特定元素存在。它同时在某种程度上解释了某些重金属元素的毒性效应。例如 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 可以取代某些酶(包括 RNA 聚合酶)的活性中心中的 Zn^{2+}(所有这些元素在周期表中同族)，从而使得这些酶失活。

辅基还可以是有机分子，此时被称作**辅酶**(coenzyme)，例如在 YADH 中的 NAD^+。有一些辅基(例如 NAD^+)仅瞬时与一些酶分子缔合，起到了**共底物**(cosubstrate)的作用。另一些辅因子，比如**辅基**(prosthetic group)通常通过共价键与其蛋白结合，例如细胞色素 *c* 的血红素辅基就是通过血红素与蛋白质的侧链之间的许多疏水作用、氢键相互作用、共价键等紧密结合(框 17-1)。

287

具有催化活性的酶-辅基配合物称为**全酶**(holoenzyme)。全酶去掉辅基之后的无催化活性的蛋白质称作**脱辅基酶蛋白**(apoenzyme)。


脱辅基酶蛋白(无活性) + 辅基 ⇌ 全酶(有活性)

辅酶是可再生的

辅酶通过它们所参与的酶反应会发生化学变化。例如在 YADH 反应中，NAD^+ 被还原成 NADH，*为了完成这个催化循环，辅酶必须回到它的原始状态*(在该例中，NADH 必须被氧化成 NAD^+)。对于辅基，它的再生存在于酶催化反应序列的独立相中。然而，对于瞬间键合的辅酶(共底物)，例如 NADH，再生反应也可以被不同的酶催化。

许多维生素是辅酶前体

表 11-3 列出了大部分常见的辅酶及它们所参与的反应类型，在本书的其他章节将描述这些物质的结构及它们的反应机理。许多有机体不能在体内合成一些必需辅酶的特定部分，有机体所摄取的食物中存在这些物质，这些物质被称为**维生素**(vitamin)，表 11-3 还列出了常见辅酶的维生素前体。

表 11-3　普通辅酶的性质

辅酶	所催化的反应	维生素来源	人类缺乏所导致的疾病
生物胞素	羧基化	生物素	a
辅酶 A	酰基转移	泛酸盐	a

续表

辅酶	所催化的反应	维生素来源	人类缺乏所导致的疾病
钴胺素辅酶	烷基化	钴胺素(B_{12})	恶性贫血
黄素类辅酶	氧化-还原	核黄素(B_2)	a
硫锌酸	酰基转移	——	a
烟酰胺辅酶	氧化-还原	烟酰胺(烟酸)	糙皮病
吡哆醛磷酸	氨基转移	吡哆醇(B)	a
四氢叶酸	一碳基团转移	叶酸	巨红细胞性贫血
硫胺素焦磷酸	醛转移	硫胺素(B_1)	脚气病

[a] 无特异名称;在人体内缺乏很少见,或观察不到。

发现许多辅酶可以作为微生物的生长因子,也可以作为治疗人或动物体内营养不良的药物。例如 NAD^+ 的主要组成部分——**尼克酰胺**(nicotinamide),或它的羧酸衍生物**尼克酸**(niacin,见图 11-2),对于治疗被称为**糙皮病**(pellagra)的致命饮食缺乏症有很好的效果。糙皮病的主要症状包括腹泻、皮炎、痴呆。

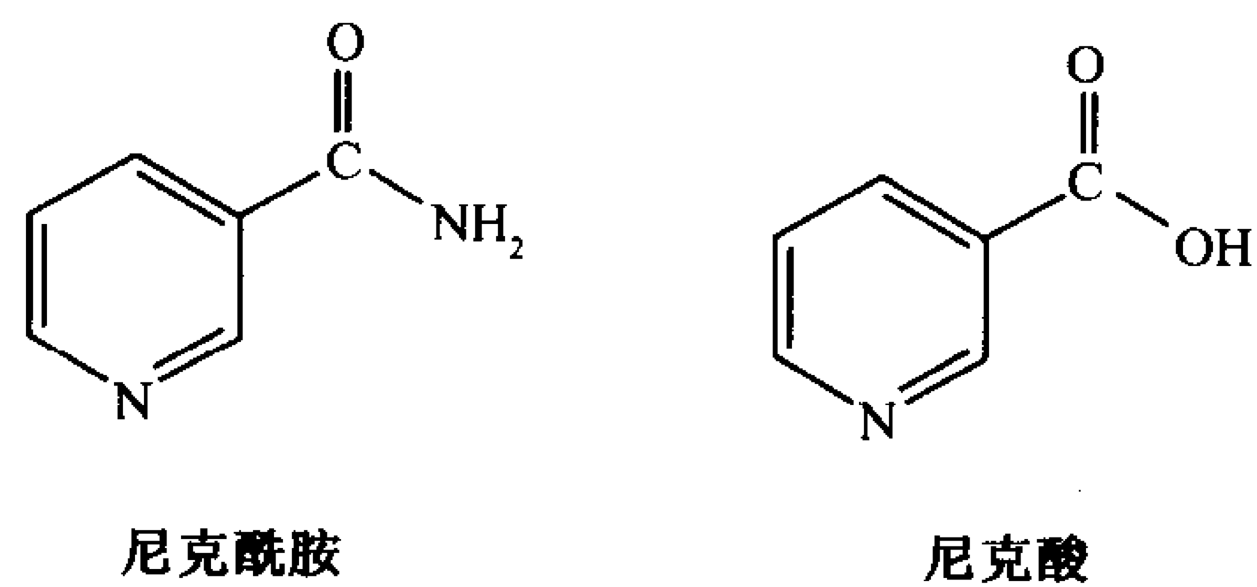


图 11-2 尼克酰胺和尼克酸的结构

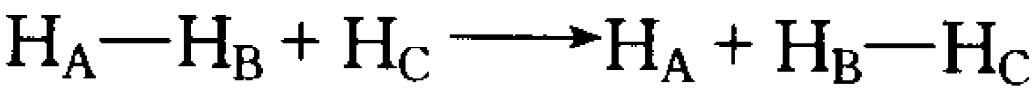
这些维生素组成尼克酰胺辅酶 NAD^+ 和 $NADP^+$ 的氧化还原作用的组成成分(与图 3-4 比较)。

人类饮食中的辅酶前体都是水溶性的,与此相反,脂溶性维生素,如维生素 A 和 D,尽管在许多高等动物的饮食中也有痕量存在,但它们不是辅酶的组成部分。人类的祖先可能就像许多现代的植物和微生物一样,能够合成各种各样的维生素,然而由于维生素通常存在于高等动物的饮食中,或可由寄居在消化系统内的细菌合成,因此人体自身大量合成维生素的功能在进化中逐渐消失了。

2. 活化能和反应坐标

288

我们对于酶如何催化化学反应的理解大多来自**过渡状态理论**(transition state theory),该理论是由 Henry Eyring 在 20 世纪 30 年代首先提出来的。考虑一个包含 3 个原子的双分子反应,例如一个氢原子与双原子分子氢气反应,生成一个新的氢气分子和一个新的氢原子:



$$H_A—H_B + H_C \longrightarrow H_A + H_B—H_C$$

在这个反应中,H_C 必须接近双原子分子 $H_A—H_B$,在反应中的某一刻,存在一个高能配合物 $H_A\cdots H_B\cdots H_C$(不稳定)。在这个复合物中,$H_A—H_B$ 共价键即将断裂,而 $H_B—H_C$ 即将生成。体系中能

量最高的一点被称作**过渡态**(transition state)。

反应物通常沿最少的自由能路径靠近另一个,用自由能对反应历程作图就得到了**过渡状态图**(transition state diagram)或**反应坐标图**(reaction coordinate diagram)(见图 11-3)。反应物和产物处于自由能最小的状态,过渡态对应着图中的最高点。对反应 $H + H_2$,反应物和产物有相同的自由能(图 11-3a)。如果反应体系中的原子是不同种类的,如反应:



$$A + B \longrightarrow X^{\ddagger} \longrightarrow P + Q$$

其中 A 和 B 是反应物,P 和 Q 是产物,$X^{\ddagger}$ 代表过渡状态。由于反应物和产物的自由能不同,因此过渡状态曲线不再对称。在此情况中,过渡状态自由能 $\Delta G^{\ddagger}$ 比反应物自由能小,称为**活化自由能**(free energy of activation)。

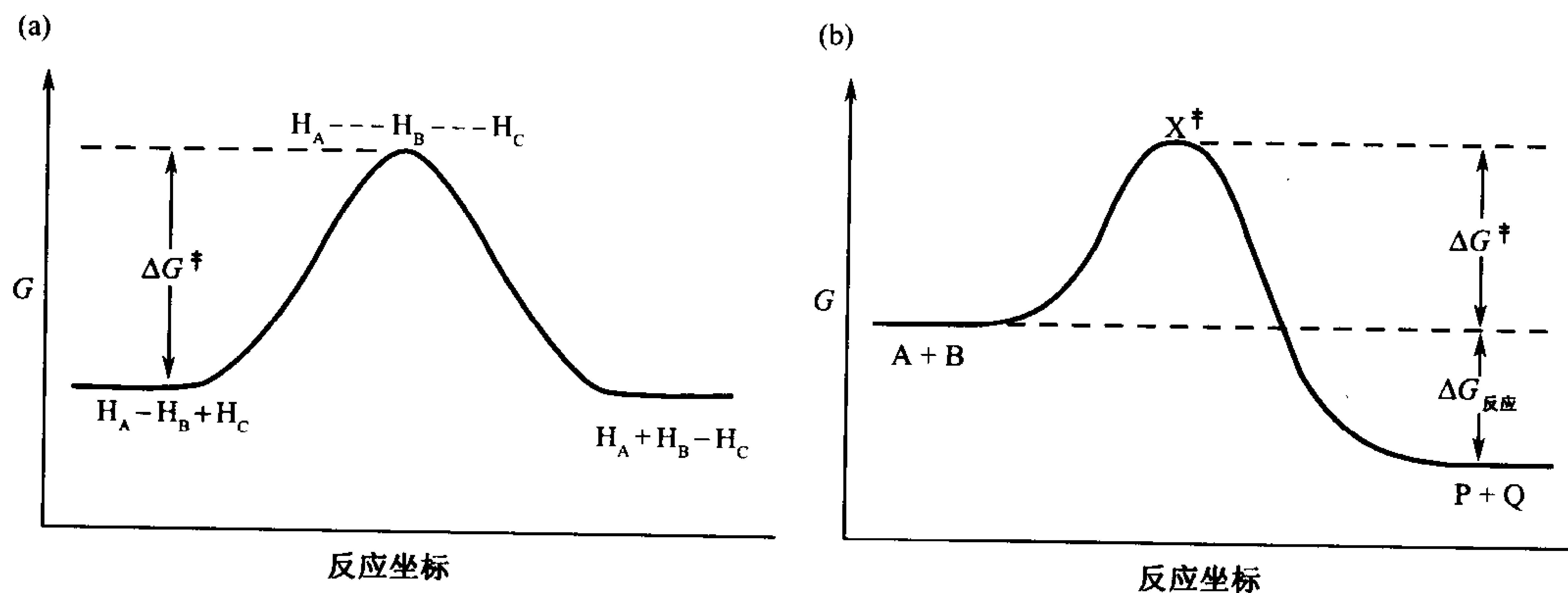


图 11-3 过渡态图

(a) $H + H_2$ 反应。反应物和产物对应于低自由能结构。自由能最高点是过渡态,在该状态下反应物部分转变为产物。$\Delta G^{\ddagger}$ 是活化自由能,是反应物与过渡态 $X^{\ddagger}$ 之间自由能之差。(b) 反应 $A + B \longrightarrow P + Q$ 的过渡态图示。这是一个自发反应;也就是,$\Delta G_{反应} < 0$(P + Q 的自由能小于 A + B 的自由能)。

过渡状态存在的时间仅为 $10^{-13} \sim 10^{-14}$s,所以在反应体系中过渡态的浓度非常小,从过渡态分解为产物(或回到反应物)被认为是整个反应的限速过程。热力学理论认为反应速率与 $e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT}$ 成正比,其中 R 是气体常数,T 是绝对温度。这样 $\Delta G^{\ddagger}$ 的值越大,反应速率越慢。这是由于 $\Delta G^{\ddagger}$ 越大,有足够热能达到过渡状态自由能的反应物分子数就越少的缘故。

化学反应通常包括几个步骤,以一个两步反应为例,如



$$A \longrightarrow I \longrightarrow P$$

其中 I 是反应的一个中间物,存在两个过渡态和两个活化能垒,这种反应的过渡状态曲线的形状反映了两个步骤的相对速率(图 11-4)。如果第一步反应的活化能高于第二步,则第一步反应将比第二步慢,反之结论也相反。在一个多步反应中有最高过渡状

289

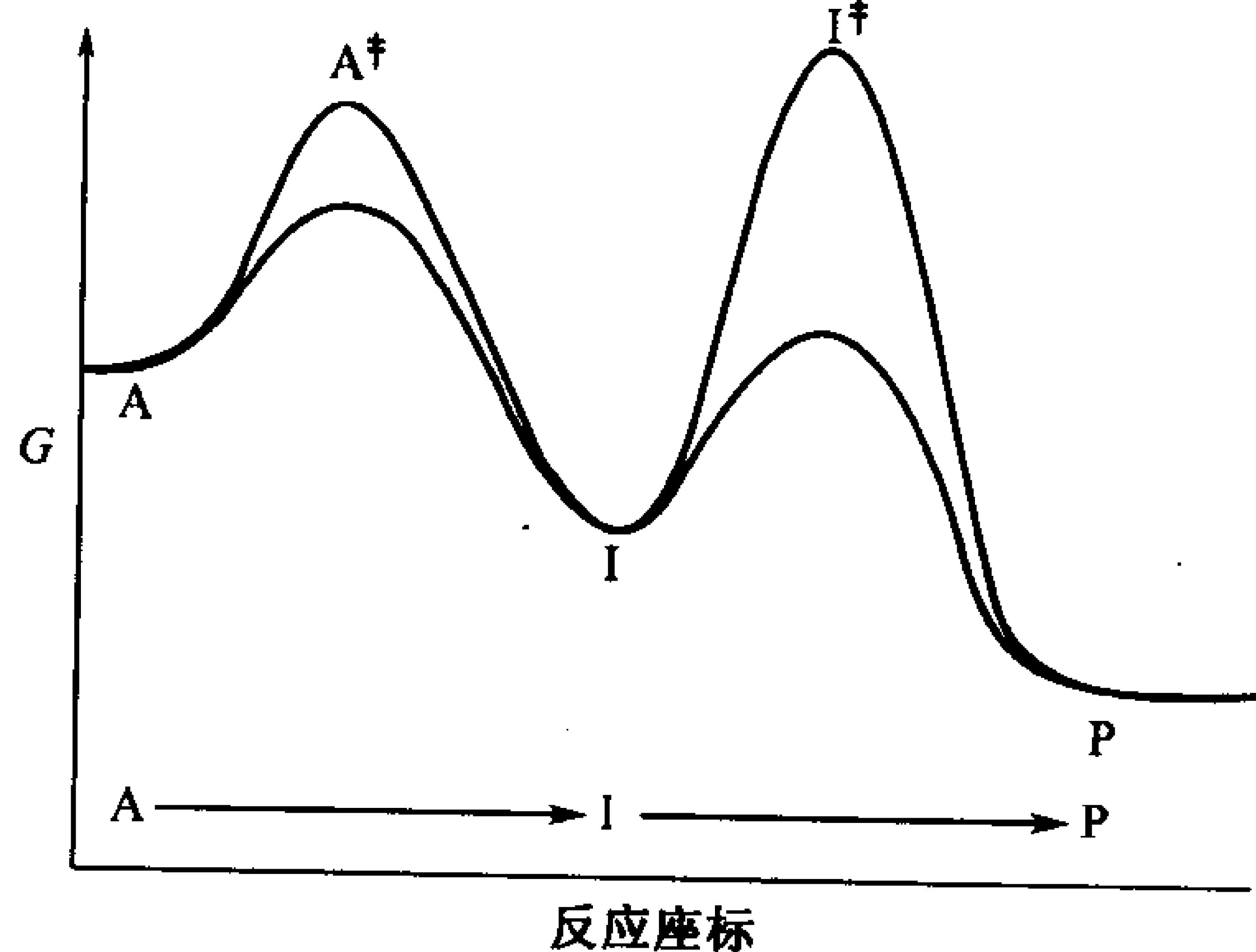


图 11-4 两步反应的过渡态图示

蓝线(上方的曲线)代表第一步为限速步骤的反应($A \longrightarrow I \longrightarrow P$),红线(下方的曲线)代表第二步为限速步骤的反应。

态活化能的步骤起着一个瓶颈的作用，因此也称为是反应的**限速步骤**(rate-determining step)。

催化剂可以减少 $\Delta G^{\ddagger}$

催化剂通过降低被催化反应的过渡状态自由能而起作用(图 11-5)。非催化反应和催化反应的 $\Delta G^{\ddagger}$ 之差 $\Delta\Delta G^{\ddagger}_{cat}$ 说明催化剂的效率。**速率的增强**(rate enhancement)(催化反应和非催化反应速率之比)由 $e^{-\Delta\Delta G^{\ddagger}_{cat}/RT}$ 决定。当 $\Delta\Delta G^{\ddagger}_{cat}$ 为 $5.71 kJ\cdot mol^{-1}$(比典型氢键自由能的 1/2 还要小)时，速率就可以增加十倍。同样，当 $\Delta\Delta G^{\ddagger}_{cat}\approx 34 kJ\cdot mol^{-1}$(大部分共价键自由能的几分之一)时，反应速率增加 100 万倍。从理论上说，如此好的催化效率似乎是来自于酶的活性区的反应基团之间的接触，这些基团在原子水平上到底是如何起作用的，这是本章和其他章节所要研究的主题。

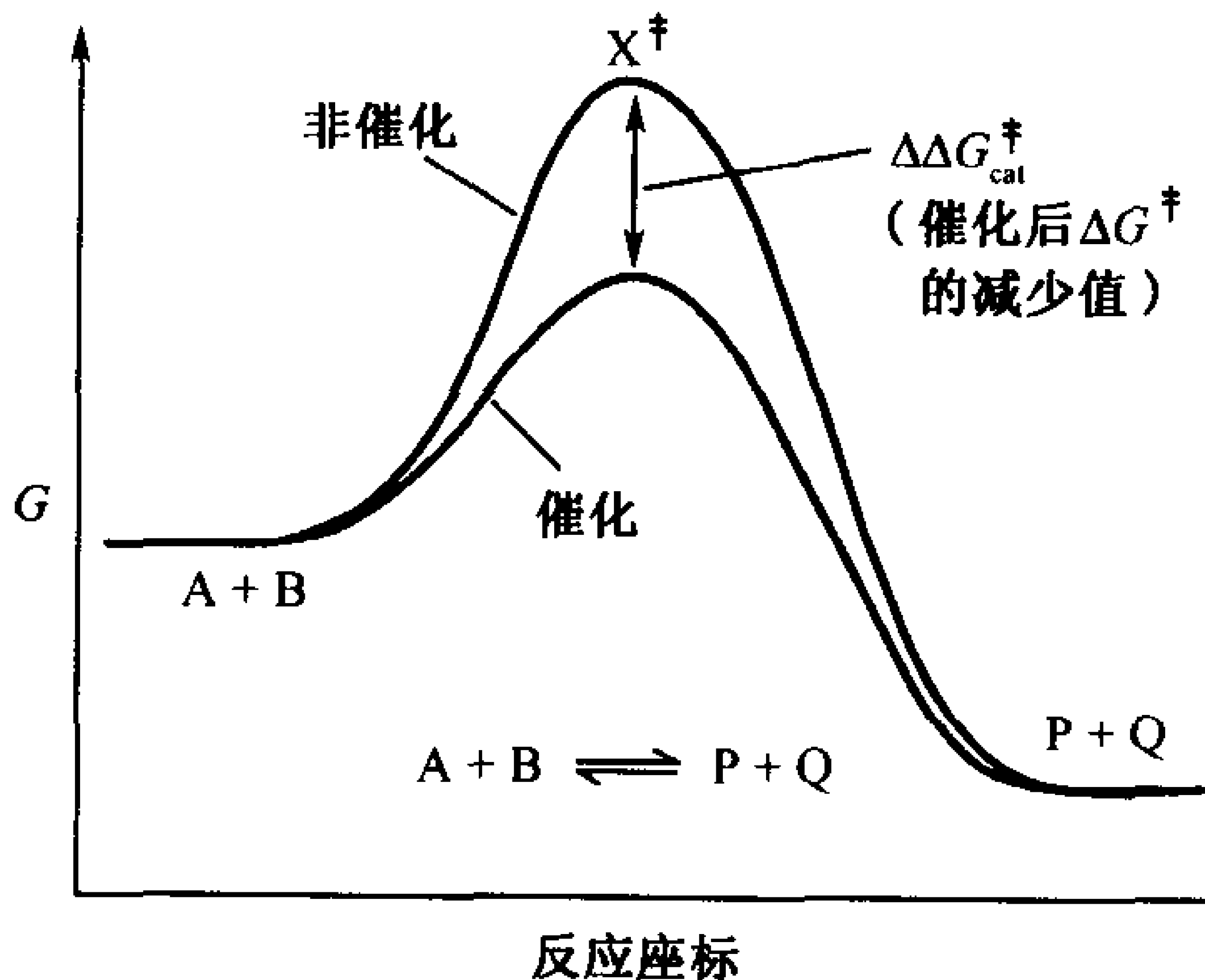


图 11-5 催化剂对反应过渡态的影响
图中，$\Delta\Delta G_{cat}^{\ddagger} = \Delta G(uncat)^{\ddagger} - \Delta G(cat)^{\ddagger}$。

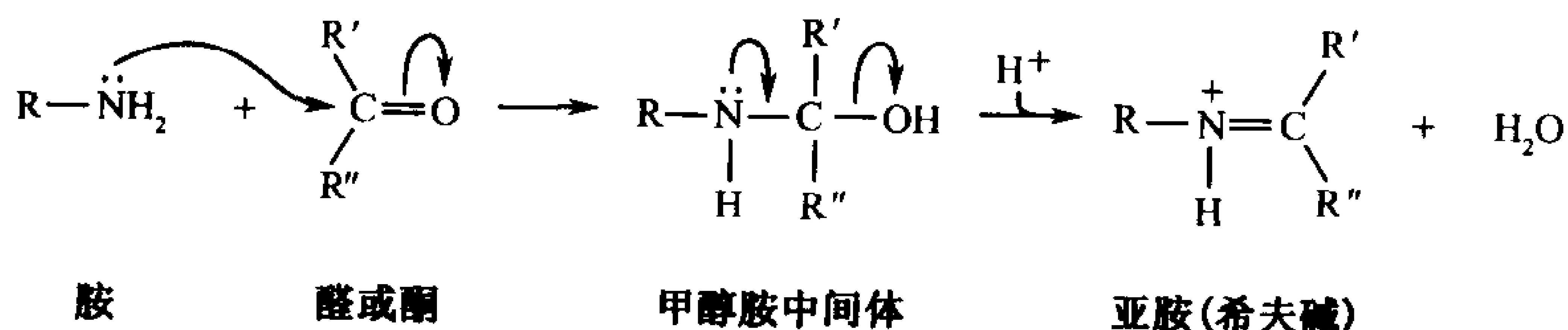
290

注意到催化剂可以等量降低正逆反应自由能的能垒(图 11-5)，其结果是催化剂等量加速正逆反应。注意，催化剂可以加速反应物转换为产物(产物转换为反应物)，出现在一个或另一个方向上的净反应的可能性仅取决于反应物和产物的自由能之差。如果 $\Delta G_{反应}<0$，反应自发地从反应物向产物进行；如果 $\Delta G_{反应}>0$，逆反应自发进行。酶不能改变 $\Delta G_{反应}$，它只能减少 $\Delta G^{\ddagger}$，使得反应比无催化剂时更快地达到平衡，此时正逆反应速度相同。反应物转化为产物的真实速率正是动力学所要研究的问题。

3. 催化机理

酶通过与其他化学催化剂相同的催化机理实现了极高的速率加速，在进化过程中酶得到了更好的设计。像其他催化剂一样，酶降低了过渡状态的自由能($\Delta G^{\ddagger}$)，即它们使催化反应的过渡状态变得稳定。使得酶成为如此有效的催化剂的原因在于它们催化基团的排列使得与底物间的结合更有特异性。然而正如我们所看到的，底物结合基团与催化基团的差别在某种程度上是任意的。

通过检测模型化合物相对应的非酶催化反应，我们可以了解到很多酶催化反应的机理。为跟踪由反应物转移到产物的电子对的重排，可以用**曲线箭头法**(curved arrow convention)来描述这两类反应。电子对(孤对电子或形成共价键的电子对)的移动由曲线箭头表示，它由电子对开始，指向吸引电子的缺电子中心。例如一个胺和醛或酮之间的重要的生化反应，亚胺(**希夫碱**)的生成，表示如下：



在第一步反应中,胺的未共用电子对加到缺电子的羰基碳上,同时 C═O 双键上的一对电子转移到 O 原子上。在第二步反应中,N 原子上的未共用电子对加到缺电子的 C 原子上,同时消去水分子。在所有时间里,化学反应规则一直适用于该体系,例如,不可能存在五根键连在 C 原子上或者两个键连在 H 原子上的情况。

酶催化反应的机理可以分为以下几类:

1) 酸碱催化
2) 共价催化
3) 金属离子催化
4) 静电催化
291
5) 靠近和定向效应
6) 过渡状态配合物的优先选择结合

下面我们依次介绍上述各种机理。

A. 酸碱催化

通常意义上的**酸催化**(acid catalysis)是从酸转移部分质子降低反应过渡态自由能的过程。例如非催化的酮-烯醇异构化反应中,由于过渡状态类负碳离子(图 11-6a,用方括号画过渡状态以显示其不稳定性)具有很高的自由能,反应速度非常慢。质子传递给氧原子降低了过渡状态的负碳离子特性,因此加速了反应(图 11-6b)。

当一个反应的部分质子被碱夺走后,反应速率增加,则该反应可被**碱催化**(base catalysis)(如

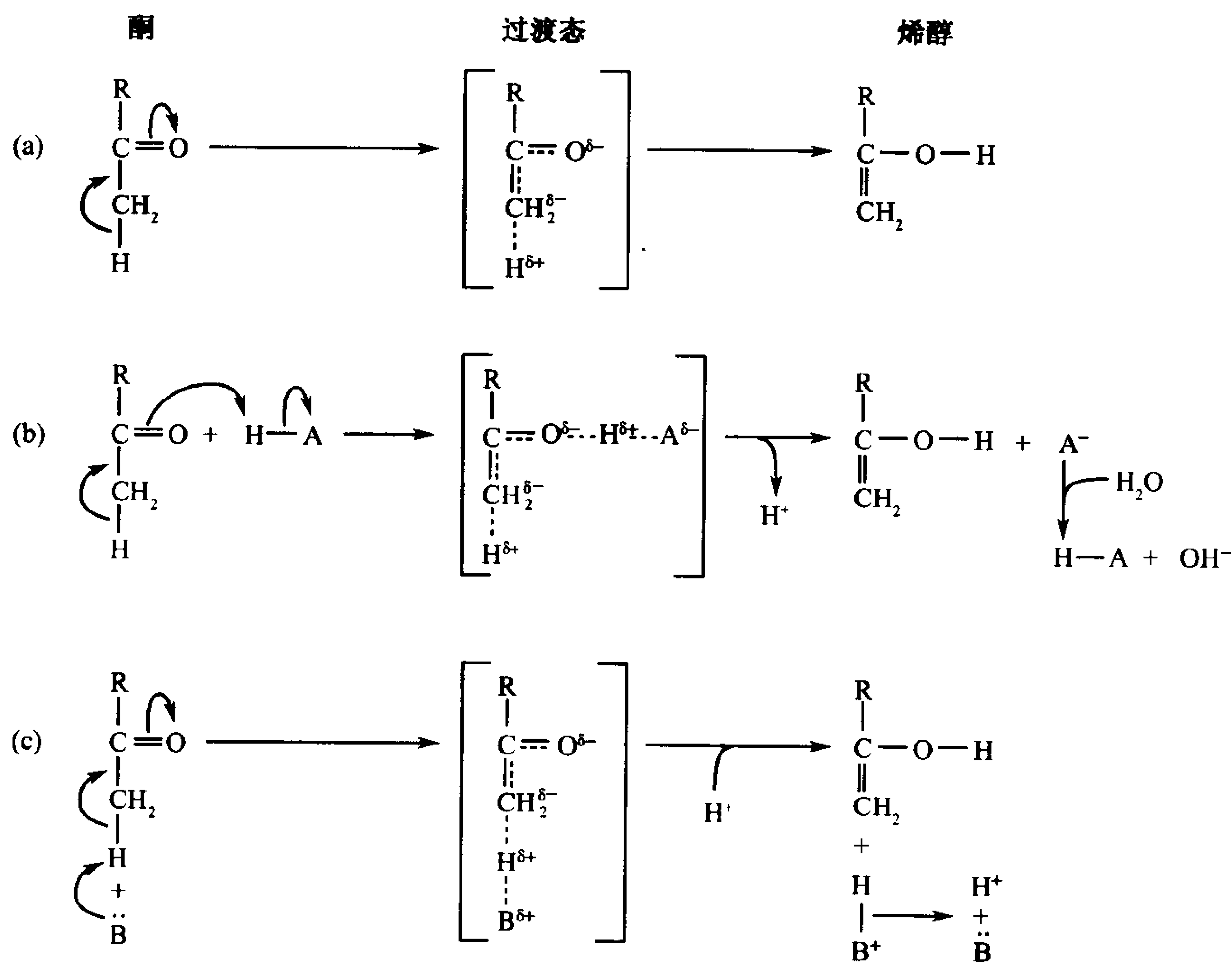


图 11-6　酮-烯醇互变异构的机理

(a)非催化。(b)普通酸催化。(c)普通碱催化。酸用 H—A 表示,碱用:B 表示。

图 11-6c)。有的反应可以同时被酸碱催化，称为**共同酸碱催化反应。**

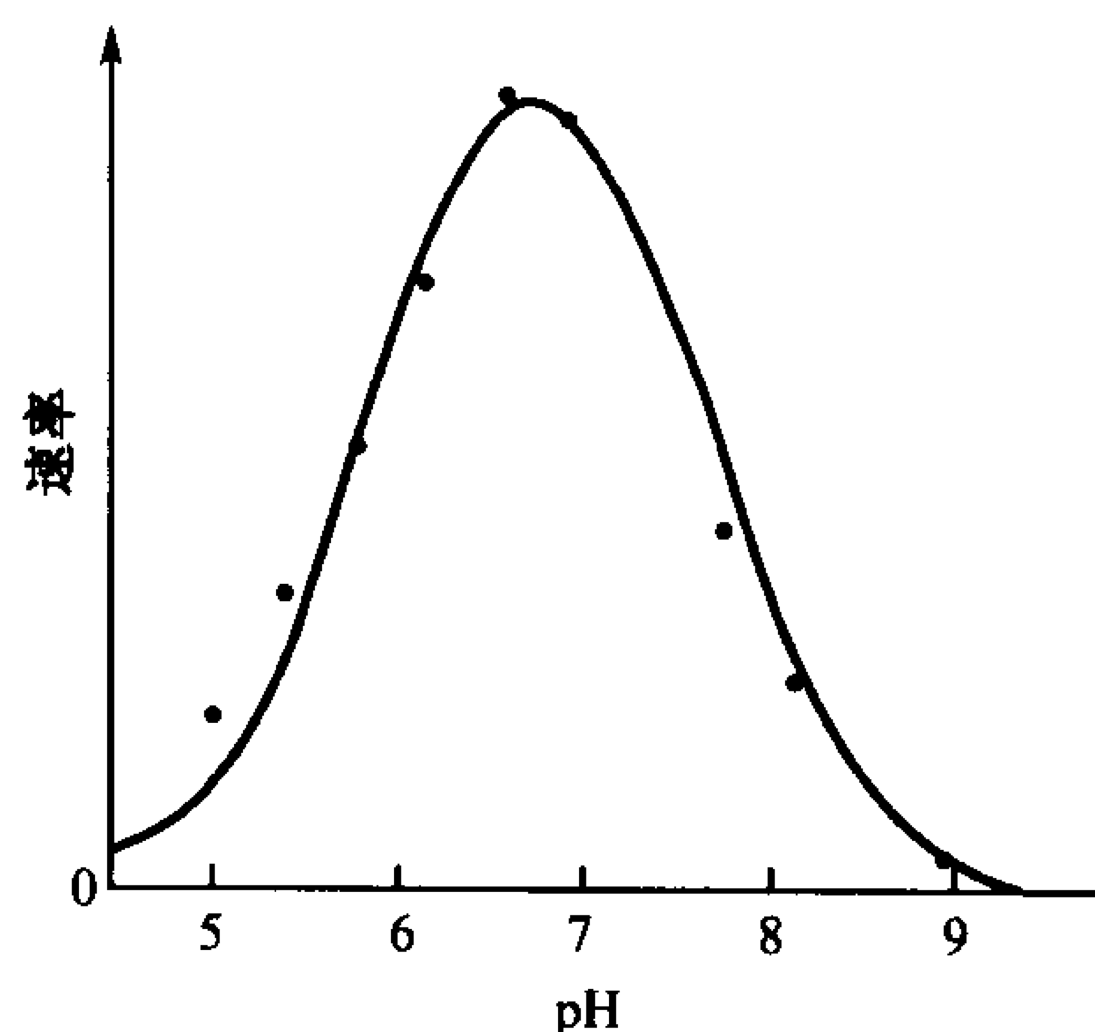
许多类型的生化反应都易于被酸或碱催化，氨基酸残基侧链 Asp、Glu、His、Cys、Tyr 和 Lys 的 p*K* 值位于生理 pH 值范围或与此接近(表 4-1)，这使得它们可以起到酸催化剂或碱催化剂的作用。事实上，*酶把几种催化官能团排列到其底物周围的这种能力使得共同酸碱催化反应成为酶催化反应的常见机理。*由于 pH 值影响活性部位侧链的质子状态，所以这些酶的催化活性对 pH 值十分敏感(见框 11-1)。

292

框 11-1 生物化学焦点

pH 值的影响

大部分蛋白质在一个很小的 pH 范围内有活性，通常是 5～9。这是 pH 值的影响与其他几个因素共同作用的结果：①底物与酶的结合；②与酶的催化活性有关的氨基酸残基的离子化状态；③底物的离子化；④蛋白结构的改变(仅在极端 pH 时才有很大影响)。



[数据来自于 Tanford, C., Physical Chemistry of Macromolecules, P. 647, Wiley(1961)]

许多酶催化反应的速率对 pH作图呈现一个钟状曲线，例如，由**延胡索酸酶**(fumarase)作催化剂时，其速率对 pH 作图所得曲线如图：

这样的曲线反映了一些氨基酸残基的离子化状态，这些氨基酸残基一定处于酶活性的特定离子化状态。所测得的 p*K* 值(曲线拐点)对于确定酶活性必需的氨基酸残基提供了重要线索。例如，p*K*≈4 说明对酶活性必需的基团是 Asp 或 Glu；p*K*≈6 或≈10 说明参与反应的残基分别是 His 或 Lys。然而，一个给定的酸碱基团的 p*K* 值，会比它的预期值改变好几个 pH 单位，它依赖于微环境，例如，在非极性环境中的 Asp 或几乎接近另一个 Asp 残基的 Asp 其吸质子能力比其他的更强，因而具有较高 p*K* 值。更有甚者，pH 对酶催化反应的影响将表现为使蛋白失活，而不是使氨基酸残基质子化或去质子化。由定点(site-directed)突变导致的特定残基的置换或由进化导致的酶变化比较是确定底物结合和催化作用所要求的残基的更可靠的方法。

核糖核酸酶 A 的反应

牛胰核糖核酸酶 A(RNase A)为酶的酸碱催化提供了一个很好的例子。这种消化酶(图 11-7)由胰腺分泌到小肠，在小肠中酶将 RNA 水解为其组成成分核苷酸。从核糖核酸酶 A 消化 RNA 中分离出 2′,3′-环核苷酸说明 2′,3′-环核苷酸是核糖核酸酶 A 反应的中间体(图 11-8)。该反应速率对 pH 的依赖说明反应包含两个可离子化的氨基酸残基，其 p*K* 值为 5.4 和 6.4。这些信息加上化学衍生物以及 X-射线研究证明核糖核酸酶 A 有两个必需的 His 残基：His 12 和 His 119，二者作为一般的酸和碱催化剂共同作用。很明显，核糖核酸酶 A 的反应是一个两步过程(图 11-8)：

1) His 12 起到碱的作用，从 RNA 2′-OH 基团中夺取一个质子，从而有利于对邻近磷原子的亲核攻击。His 119 起到酸的作用，通过将离去基团质子化促进键的断裂。
2) 2′,3′-环状中间体通过第一个步骤——水取代离去基团——的逆反应水解，这样，His 12

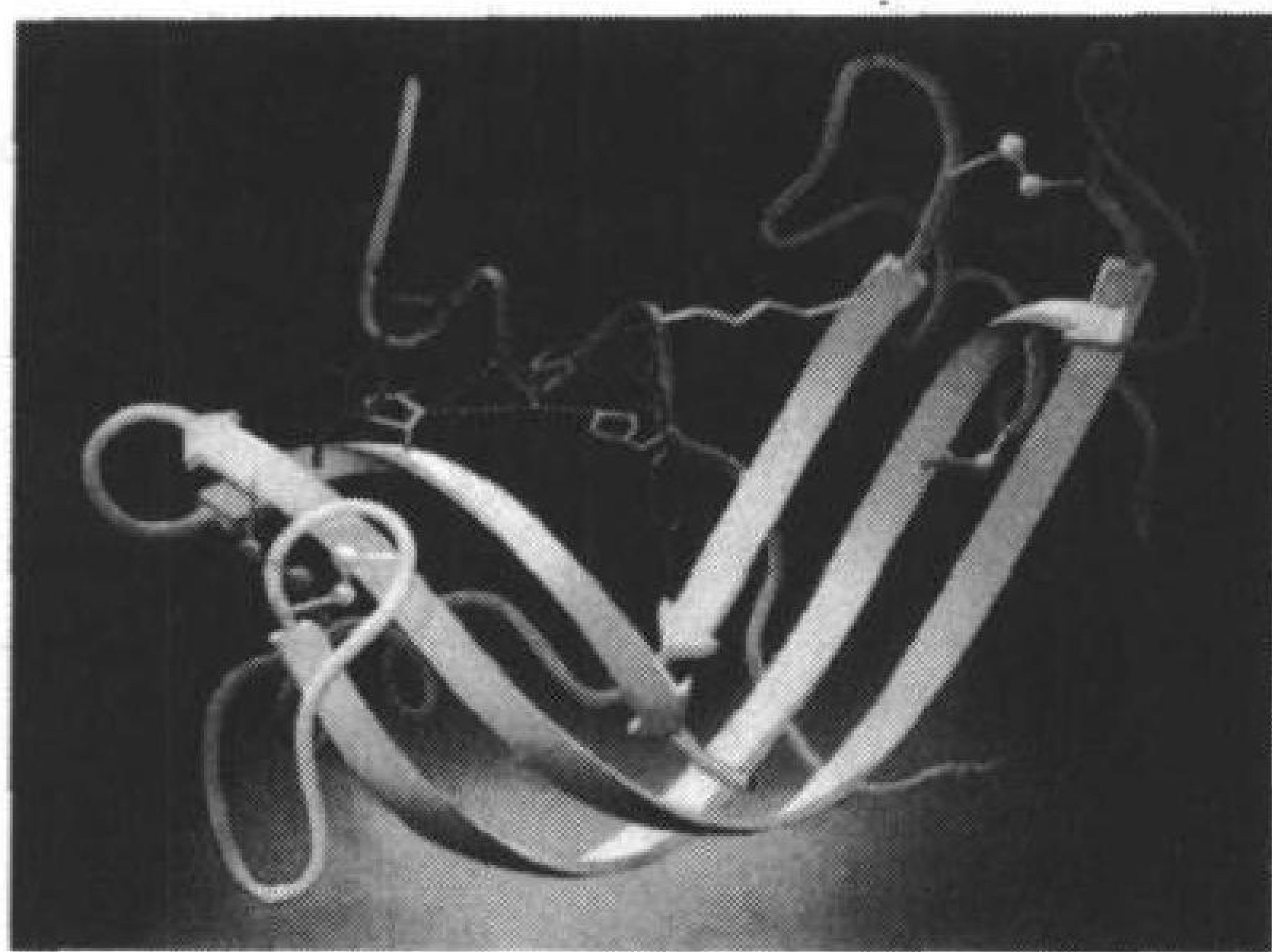


图 11-7 牛胰核糖核酸酶 S 的 X 射线衍射结构

非水解底物类似物与二核苷酸磷酸酯 UpcA 结合在活性区。RNase S 是 RNase A 的催化活性形式，其残基 20 与 21 之间的肽键被水解。(引自 Irving Geis)

将起到酸的作用，而 His 119 起碱的作用，从而生成被水解的 RNA 和原始状态的酶。

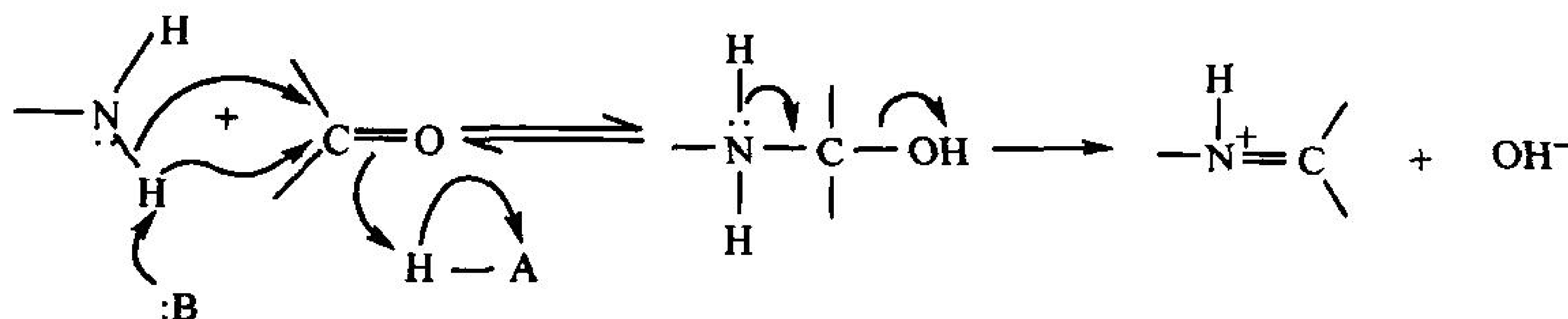
293

B. 共价催化

共价催化(covalent catalysis)*通过催化剂-底物生成瞬间共价键来加速反应速率*。通常，由催化剂上的亲核基团与底物上的亲电基团反应形成此共价键。因此，这类催化反应又被称作**亲核催化**(nucleophilic catalysis)。由伯胺催化的乙酰乙酸脱羧反应就是这样的一个例子(图 11-9)。

294

反应的第一步，亲核的胺首先进攻乙酰乙酸的羰基基团，形成希夫碱(亚胺键)。



希夫碱 (亚胺)

共价中间体中被质子化的氮原子起到电子受体的作用(图 11-9)，以降低过渡态烯醇盐的高能量。希夫碱的形成和分解非常迅速，因此它不是此反应的限速步骤。

共价催化作用在理论上可分三个步骤：

1) 催化剂和底物间形成共价键的亲核反应；

2) 通过亲电的催化剂将电子从反应中心去除；

3) 催化剂的消去，即步骤 1 的逆反应。

物质的亲核性与其碱性密切相关。实际上，亲核催化的机理与碱催化作用相似，惟一不同的是，催化剂亲电进攻底物形成共价键，而不是从底物夺走一个质子。生物学上具有重要意义的亲核试剂都带有负电或含有未共用电子对，易于与电子缺失中心形成共价键(图 11-10a)。与此相反，亲电试剂含有带正电基团，有一个未充满的价电子层或含有电负性的原子(图 11-10b)。

共价催化很重要的特征是*所形成的共价键越稳定，在反应的最后一步中它越不易分解*。因此一个良好的共价催化剂必须同时具有高亲核性和形成良好的离去基团的能力，也就是说，易发

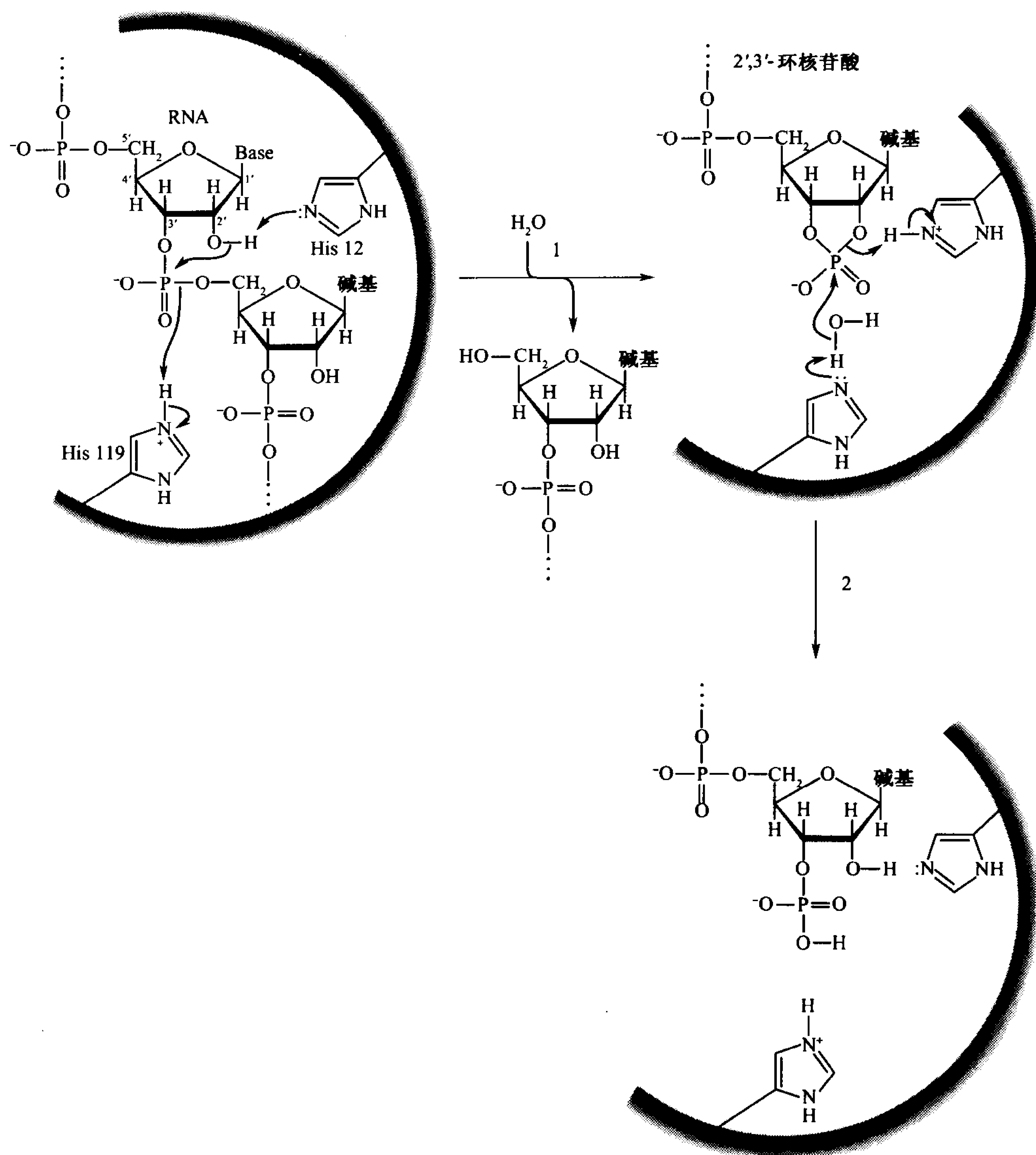


图 11-8　RNase A 机理

牛胰核糖核酸酶 RNase A 催化的 RNA 的水解是一两步反应，中间形态为 2′，3′-环核苷酸。

生键生成过程的逆反应。如咪唑和硫醇等有很高极化能力的基团（高流动性电子）具有上述特性，因此它们是很好的共价催化剂。在蛋白质中，这类官能团有 Lys 中的 ε-氨基、His 中的咪唑基、Cys 中的硫醇基、Asp 中的羰基和 Ser 中的羟基。此外，几种辅酶，尤其是**焦磷酸硫胺素**（thiamine pyrophosphate）（节 14-3B）和**磷酸吡哆醛**（pyridoxal phosphate）（节 20－2A），与它们的原酶一同起共价催化作用。通过大量的共价连接的酶-底物反应中间体的分离证明酶通常采用共价催化作用机理。

295

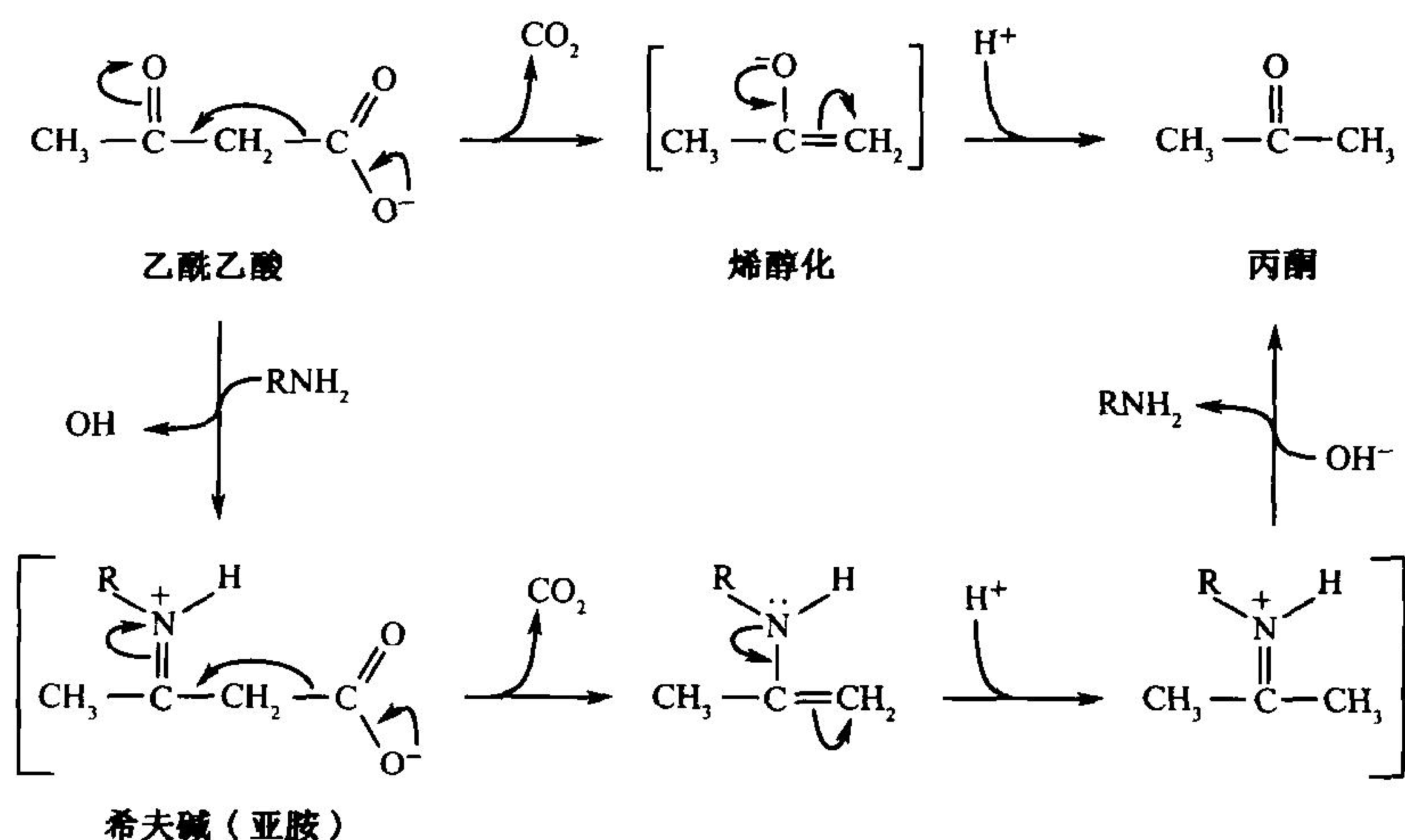


图 11-9 乙酰乙酸的脱羧作用
上端为非催化反应的机理，下端为由伯胺催化的机理。

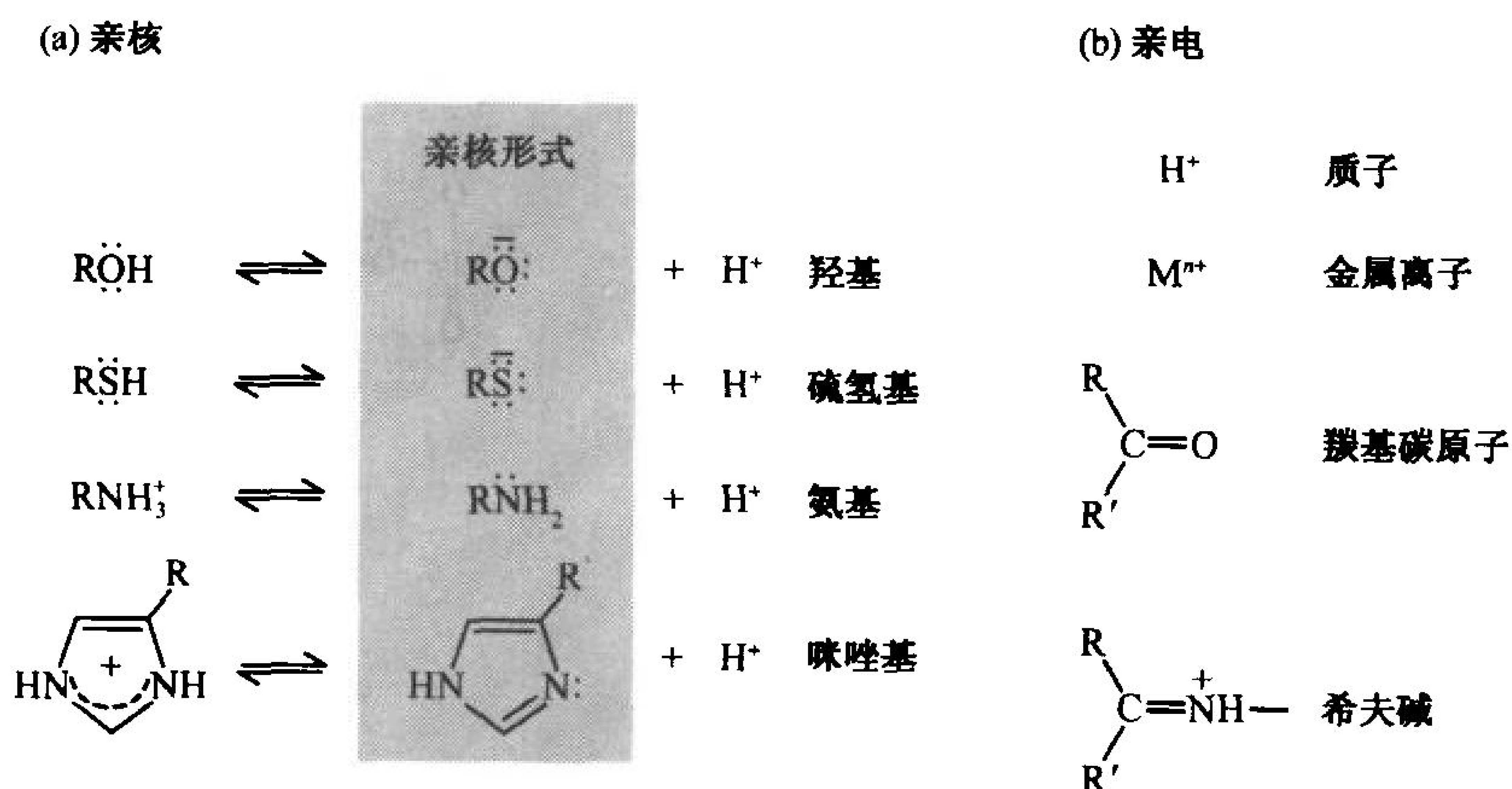


图 11-10 生物上重要的亲核和亲电基团
(a)亲核基团如羟基、巯基、氨基和咪唑基等的碱性形式是亲核试剂。(b)亲电基团含有一个缺电子原子(红色)。

C. 金属离子催化

在所有已知的酶中，有近乎三分之一的酶要求有金属离子才具有催化活性。这一类酶包括含有紧密结合的金属离子辅基的**金属酶**(metalloenzyme)，大多数为常见的过渡金属离子，如 Fe^{2+}、Fe^{3+}、Cu^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+} 和 Co^{2+}。与此相对，在溶液中与金属离子松散结合的**金属活化酶**(metal-activated enzyme)，通常是碱金属离子或碱土金属离子，如 Na^+、K^+、Mg^{2+} 和 Ca^{2+}。在这类酶中，离子通常起到结构作用而不是催化作用。

金属离子主要通过以下三个途经参与催化作用：

1）通过与底物结合使之易于反应。

2）通过金属离子价态的可逆变换介导氧化还原反应。

3) 通过静电稳定或屏蔽负电荷。

在许多金属离子催化反应中，金属离子像质子一样中和负电。但是金属离子与质子相比是更有效的催化剂，这是由于金属离子在 pH 值为中性时也可以有很高的浓度，且其电荷可高于 +1。

金属离子所带电荷还使得其周围的水分子比自由的水分子更呈酸性，因而甚至在 pH 低于中性时仍存在亲核的 OH^-。碳酸酐酶的催化机理就是一个很好的例子（框 2-2），该酶催化如下反应：



$$CO_2 + H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H^+$$

碳酸酐酶中含有必需的 Zn^{2+}，其催化机理如下：

1) 人体内碳酸酐酶的晶体结构（图 11-11）显示 Zn^{2+} 在 15Å 深的活性区裂缝的底部，在那里 Zn^{2+} 与三个进化过程中保守的 His 侧链和一个水分子配位呈四面体结构，这种 Zn^{2+} 极化的水分子通过由第四个 His 残基促进的碱催化反应而离子化。

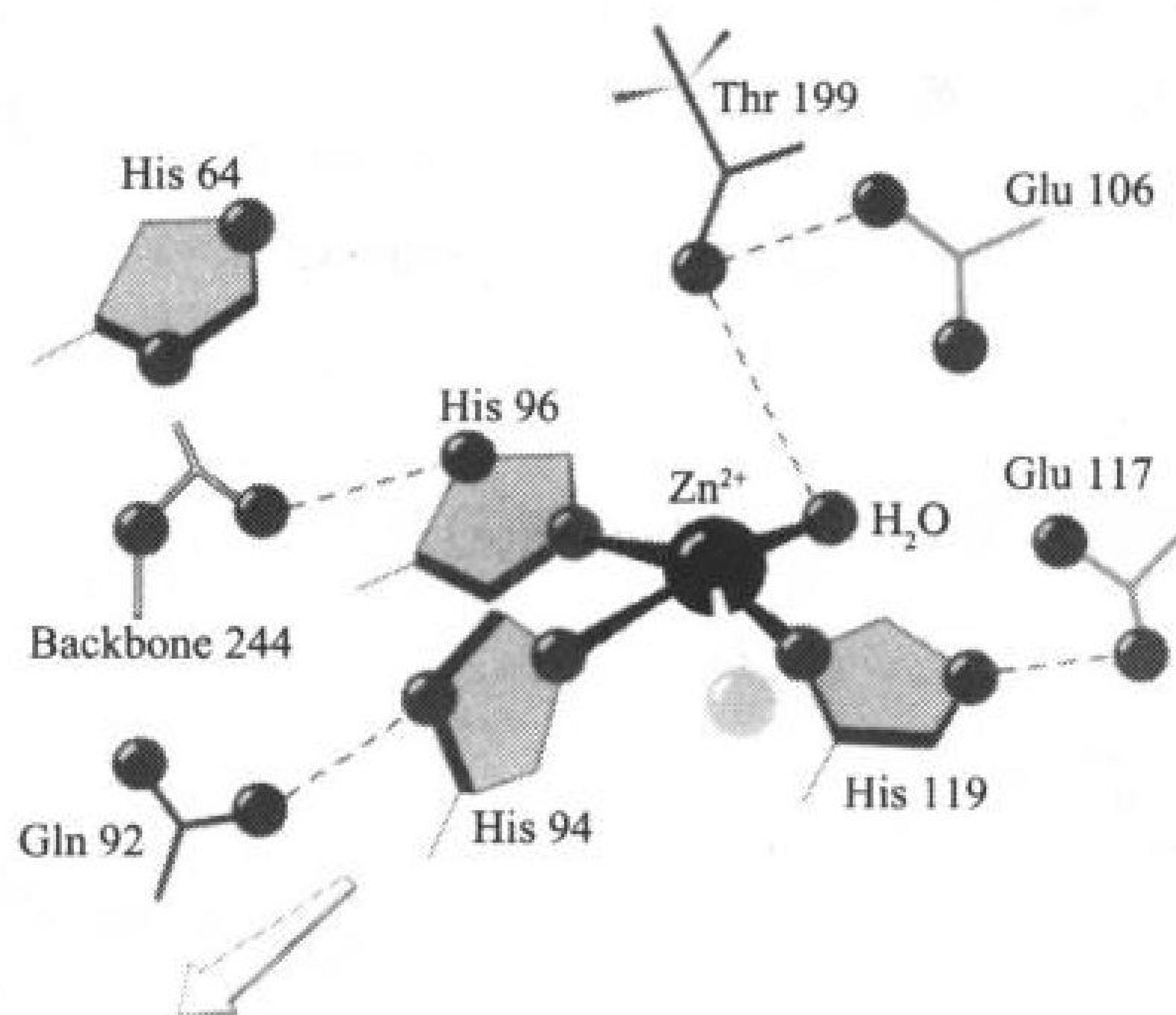
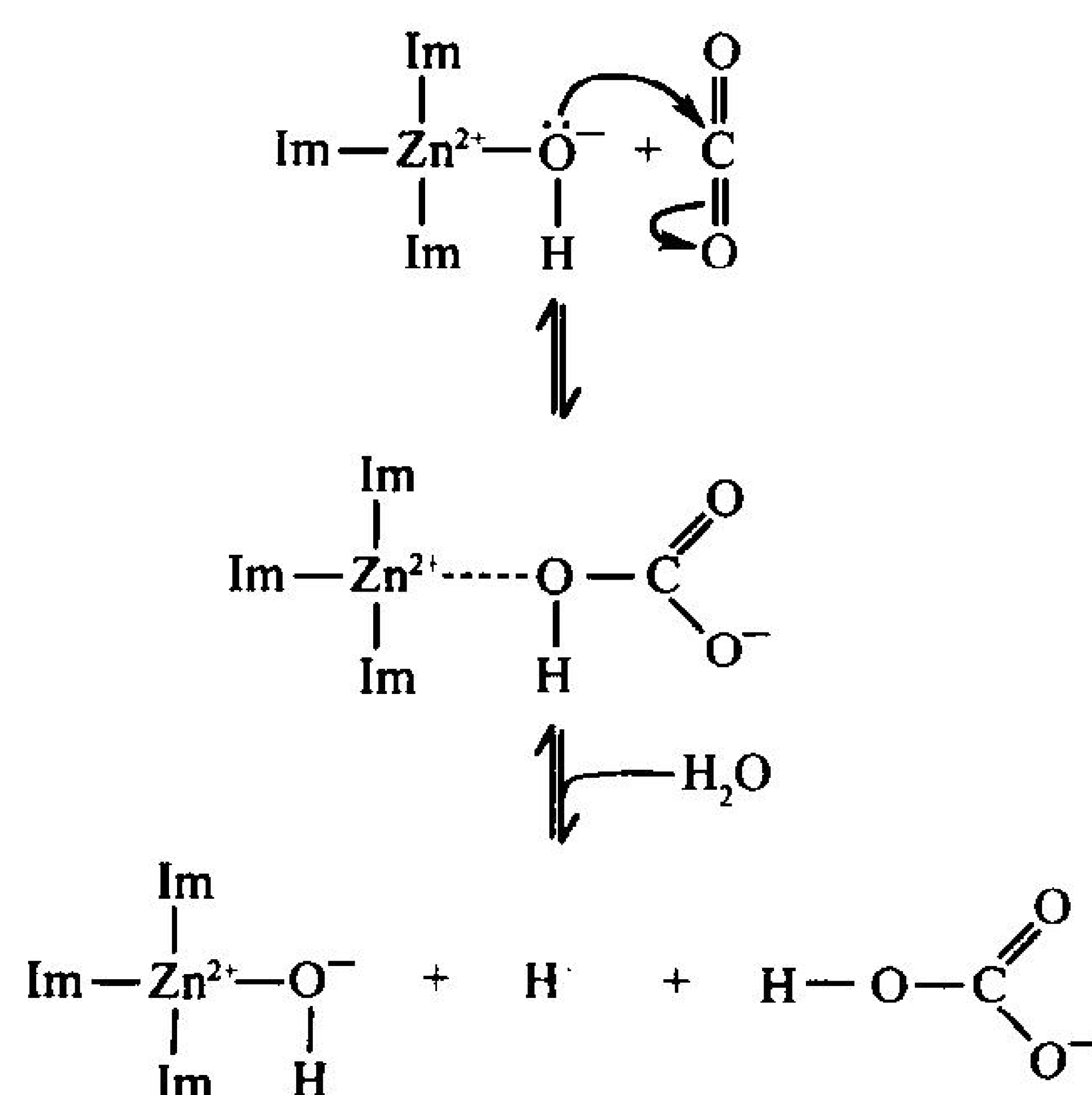


图 11-11　人碳酸酐酶的活性中心

淡蓝色配体配位到 Zn^{2+} 上证明可能存在着 Zn^{2+} 的第五配位位点，箭头指向活性中心空穴的开口。［引自 Sheridan, R. P. and Allen L. C., J. Am. Chem. Soc., 103, 1545(1981)］

2) 所生成的与 Zn^{2+} 结合的 OH^- 亲核攻击邻近的 CO_2，从而将其转化为 HCO_3^-（见下图）。

3) 通过在 Zn^{2+} 上结合和离子化另一水分子而再生催化位点（见右图）。



D. 静电催化

通常底物结合时会将水排除出酶活性区之外，因此酶活性区有有机溶剂的极性特征，其静电作用比其在水溶液中时要强很多。这样，由于邻近带电基团，蛋白质氨基酸侧链的 pK 值可能会比它们的通常值（表 4-1）改变好几个单位。

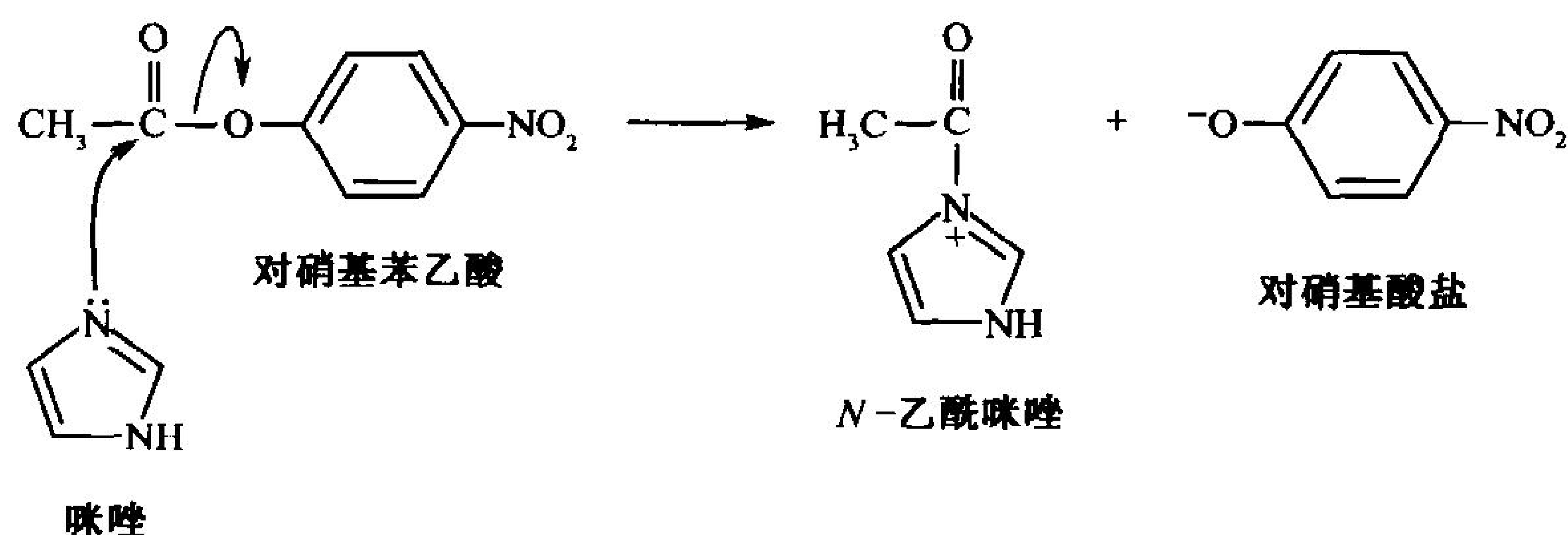
296

虽然在这个问题上的实验证据和理论分析仍很少，在

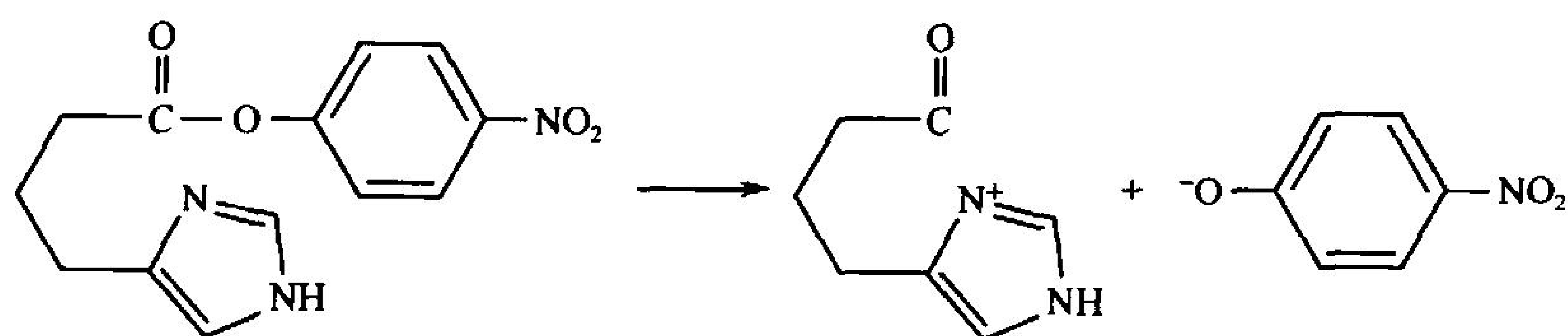
酶活性区周围的电荷分布似乎是被排列成使之稳定催化反应的过渡状态。这种与金属离子催化相似的速率增强方式被称为**静电催化**(electrostatic catalysis)。更有甚者，在几种酶中，电荷分布似乎可引导极性底物朝向其结合区，从而进一步提高反应速率。

E. 通过邻近和定向效应催化

虽然酶的催化机理和有机反应相似，但它们的催化效率远远高于有机模型。这种高催化效率一定来自酶催化区的特殊的物理结构，此结构有利于相应的化学反应。最明显的效应就是**近邻效应**(proximity effect)和**定向效应**(orientation effect)，反应物必须以一定的空间关系互相接近才能导致反应的发生。考虑咪唑与对硝基苯乙酸的双分子反应：



反应过程中产生黄色的**对硝基苯氯**(*p*-nitrophenolate)负离子，由此可方便地进行监测。相应的分子内反应



速度比前述反应快 24 倍。因此咪唑催化剂与反应物以共价键相连时，催化效率比它自由存在于水溶液中时提高 24 倍，这种速率的提高主要来自于邻近和定向效应。仅仅是通过与底物相连，酶可以通过以下三种方法促进催化反应：

1) 酶使得底物和它们的催化基团相接触，并且可以和多个底物反应。然而，建立在简单模型体系上的计算表明，仅有邻近效应时，速率提高因子不超过 5。
2) 酶使其底物在反应时处于合适的位置，分子并不是在所有的方向都具有相同的活性，事实上它们在某一恰当位置上将具有最高的活性(图 11-12)。例如，在一个 S_N2(双分子亲核取代)反应中亲核试剂在进攻靶分子时，优先选择与离去基团对应的位置(从背后进攻)。如果反应原子距最佳方向偏离 10 度，反应活性就会大大降低。据估计，正确定位的底物可以使反应速率提高 100 倍。如我们所见，酶可以调节它们的底物和催化基团，使之具有最高的活性。

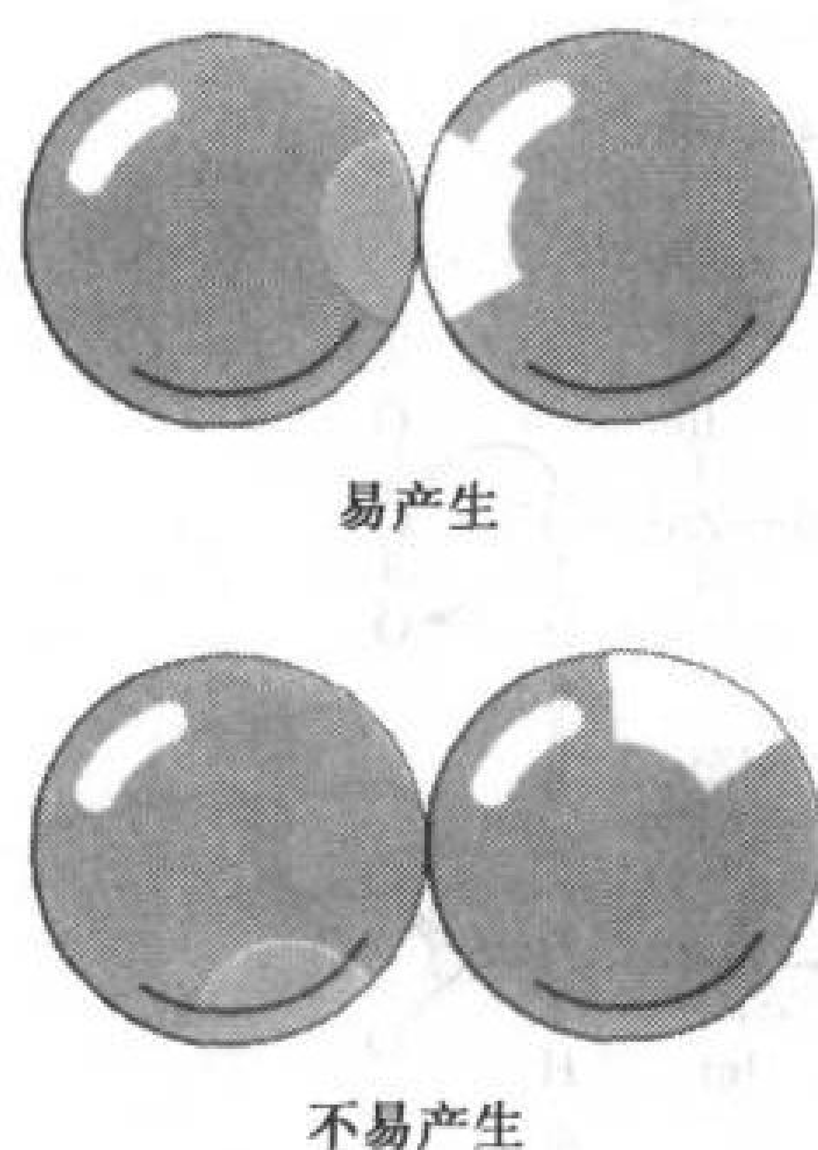


图 11-12 方向效应
在分子表面只有一些有限的区域易受化学进攻(用有色区域代表)。没有正确的取向(上)，反应就不发生(下)。

297

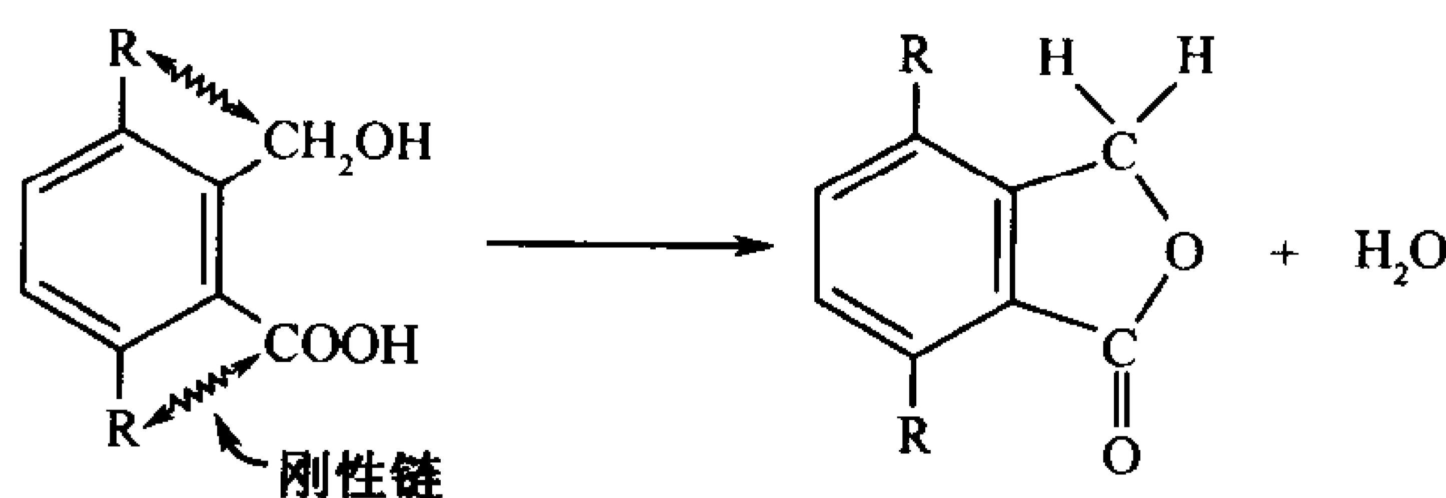
3) 酶可以减少底物和催化基团之间的相对平动和转动，这对催化来说十分重要，因为在过渡状态中，反应基团几乎没有相对运动。事实上实验表明*这种影响可以使速率提高约* 10^7 *倍*。

将底物和催化基团放在一起并使之有效定位，需要大量的熵补偿，克服这个熵损失所需的自由能由底物与酶的结合来提供。

F. 通过优先过渡态结合的催化

至今讨论过的催化机理还很难解释为什么酶催化所导致的反应速率能提高如此之多。然而我们还没有考虑酶催化的一个最重要的机理：*酶可以结合反应过渡态，它比其底物或产物催化具有更大的亲和性*。与先前所讨论的催化机理结合起来考虑，优先选择过渡态结合机理可以很好地解释观察到的酶催化反应速率。

过渡状态结合的原始概念是：酶使底物发生机械形变，使其形成适合与过渡状态结合的几何构型，而在底物未扭曲时，底物不能与结合区很好地进行楔合。这种扭曲有利于很多有机反应。例如对如下的反应：



当 R 是 CH_3 时，其速率是 R 为 H 时的 315 倍，这是因为 CH_3 与反应基团之间有较大的位阻排斥，被扭曲的反应物比未扭曲的反应物更类似于反应的过渡态。该理论首先由 Linus Pauling 提出，后来由 Richard Wolfenden 和 Gustav Lienhard 扩充并发展了此理论：*酶优先选择过渡态结构，由此增加了它的浓度，使之提高了反应的速率*。

酶相对于其底物与反应过渡态结合越紧密，催化反应速度就越快，也就是说催化作用是由于优先选择结合而产生的，故过渡状态相对于底物是稳定的（图 11-13）。换句话说，酶-底物复合物（ES）和酶-过渡状态复合物（$ES^‡$）之间的自由能之差小于非催化反应中 S 和 $S^‡$ 之间的自由能差。

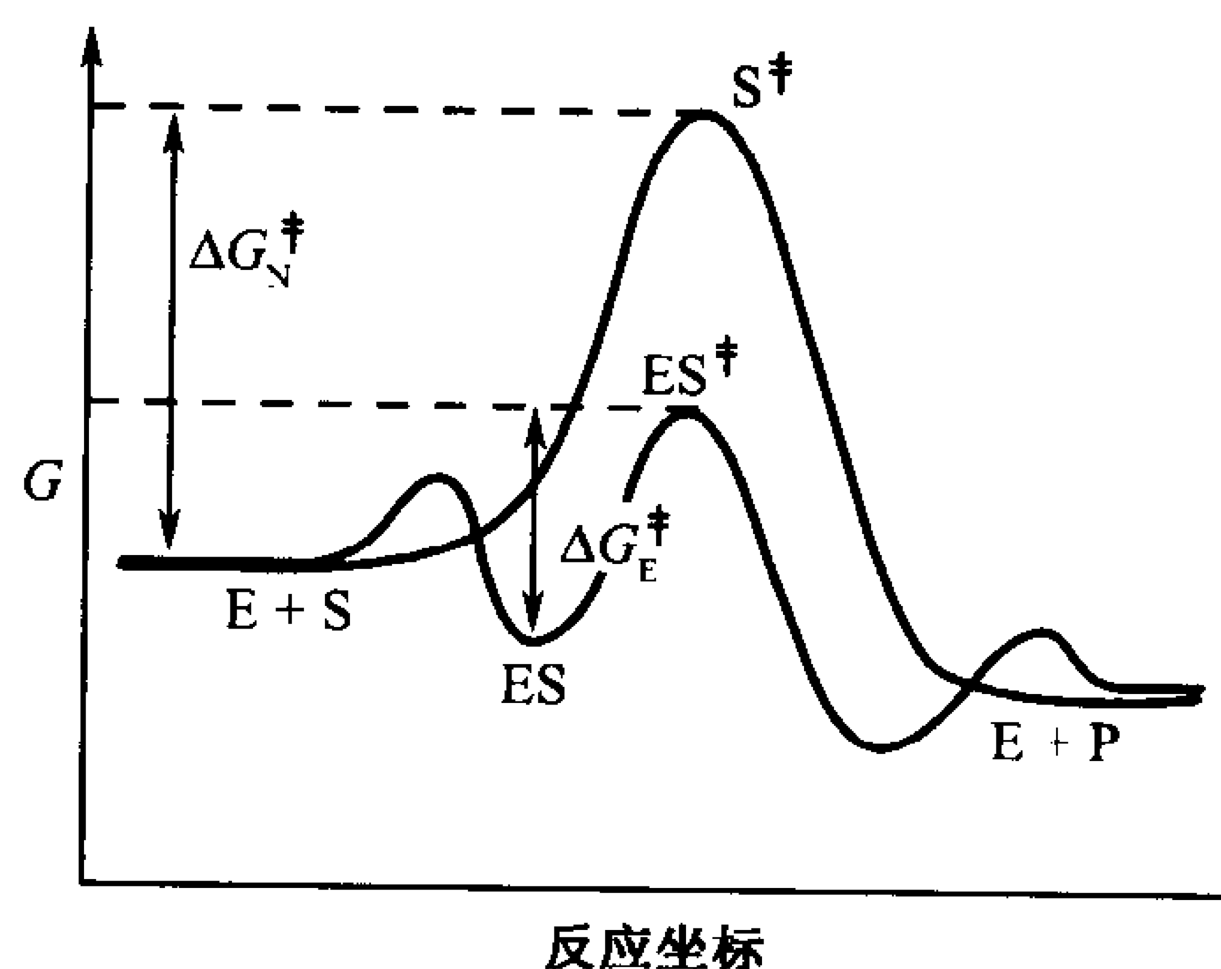


图 11-13　*功能的秘诀*：优先过渡态结合的影响

理想酶催化反应（单底物）的反应坐标曲线为蓝色，非催化反应的反应坐标曲线为红色。$\Delta G_N^‡$ 是非酶反应的活化自由能，$\Delta G_E^‡$ 是酶促反应的活化自由能。在酶催化反应的反应坐标曲线中，有一小尖峰从酶与底物和产物结合之处升起。

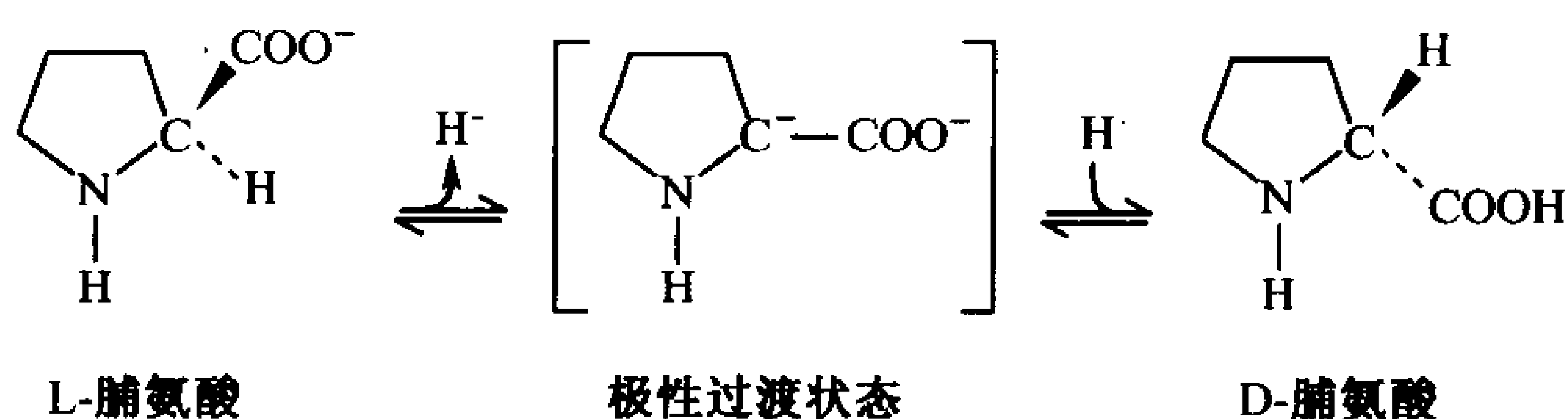
298

正如我们在节 11-2 中看到的，催化反应的速率增值由式 $e^{\Delta\Delta G_{cat}^‡/RT}$ 给出，其中 $\Delta\Delta G_{cat}^‡$ 是非催化反应自由能（$\Delta G_N^‡$）和催化反应自由能（$\Delta G_E^‡$）变化之差。这样如果速率提高 10^6 倍，就要求酶与其过渡态结合的亲和力是酶与其底物结合的 10^6 倍，这就相当于在 25℃ 时使其稳定所需要的自由能为 34.2kJ/mol，这约为两个氢键的自由能。当底物首先与酶结合时，以这个单独的影响来考虑，通过两个不能形成氢键的酶的过渡态的结合就使反应速率增强了 10^6 倍。

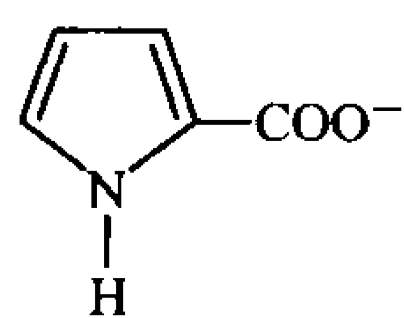
酶与反应速率比较低的差底物结合，很可能比与反应速率比较高的好底物结合更好。这样，好的底物不一定会与具有很高亲和性的酶结合，但在活化到过渡状态时会有很高的亲和力。

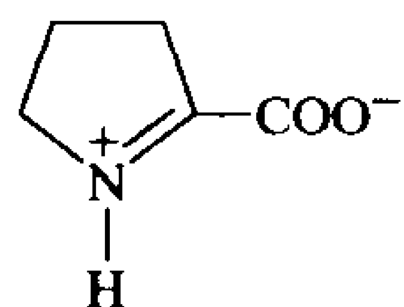
过渡态类似物是酶的抑制剂

如果酶与其过渡态优先结合，**过渡状态类似物**(transition state analog)，这些在几何构型及电子状态上都与过渡态相似的稳定分子，被认为是酶的有效抑制剂。例如从 *Clostridium sticklandii* 中来的**脯氨酸外消旋酶**(proline racemase)催化的反应被认为是通过一个平面过渡状态发生的：



脯氨酸外消旋酶被吡咯氨酸的平面类似物**吡咯-2-羧酸**(pyrrole-2-carboxylate)和**Δ-1-吡咯啉-2-羧酸**(Δ-1-pyrroline-2-carboxylate)所抑制。





二者与酶之间的亲和力比吡咯氨酸大160倍，因此这些化合物被认为是该反应的过渡状态类似物。已报道了几百种过渡状态类似物，其中一些是天然存在的抗生素；另一些被设计用来研究特定酶的反应机理或在医疗和农业领域内作为某些酶的抑制剂。事实上，酶和过渡状态相结合时比与底物结合具有更高的亲和力，这一理论被作为药物设计的理论基础。过渡状态结合理论同时也解释了为什么过渡态类似物的抗体可以催化相应的反应(见框11-2)。

4. 溶菌酶

300

在这一章余下的部分里，我们将研究一些酶的催化机理，来看一看酶是如何遵循前面所描述的催化规律的。

溶菌酶是一种可以破坏细胞壁的酶，它可以水解细胞壁中肽聚糖的 β(1→4)糖苷键，此键为

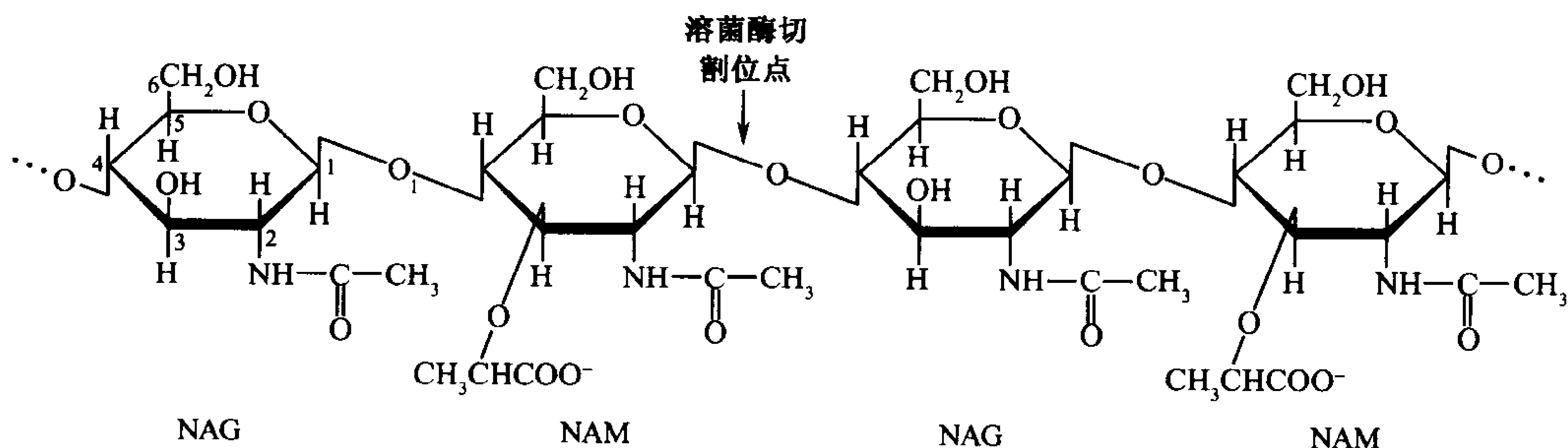


图 11-14 溶菌酶切割位点

酶切割位点位于构成细菌细胞壁的交替 NAG-NAM 多糖上的 β(1→4)键。

框 11-2　生物化学焦点

催化抗体

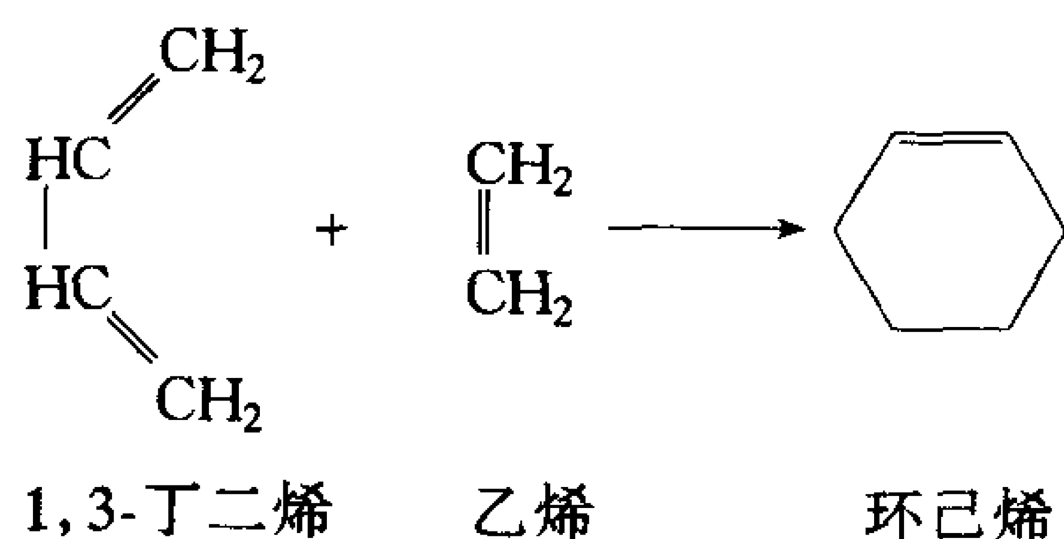
抗体和酶都以高专一性和高亲和性与化合物相结合，当发现抗体具有催化活性时，对这种性质深入地进行了研究。然而，催化抗体不是与底物紧密结合，而是与反应的过渡状态紧密结合。这种催化抗体或**抗体酶**(abzymes)的发展，证实了过渡状态的稳定是酶催化效力的基础。

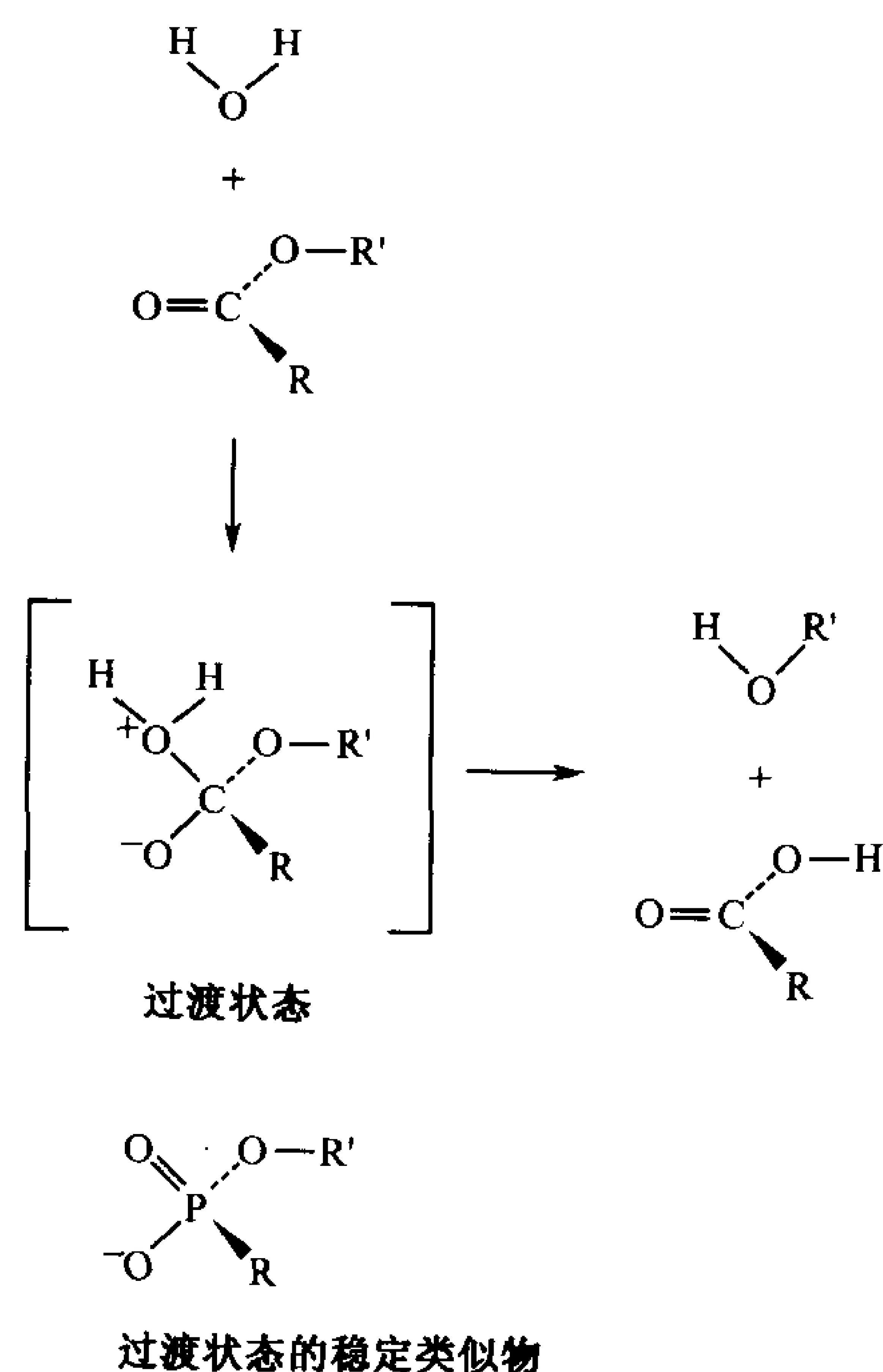
第一个催化抗体来自于设计的模拟酯解反应过渡态的化合物。

与过渡状态相似的四面体磷酸盐负离子化合物与平面中性的底物或产物明显不同。与载体蛋白相结合(它本身太小，以至于不能作为抗原)的磷酸盐，释放出具有酶结合特性的抗体。有一些抗体可以使底物水解速率增加一千倍。

进一步研究显示可以生成能催化许多反应的抗体，有时反应速率可以比非催化反应增加 10^8 倍，此类速率的提高是典型的酶的特征。另一些抗体催化反应的特征使人联想到酶催化反应，例如，催化作用所存在的抗体的抗原结合区含有可离子化的氨基酸侧链，其活性与 pH 值有关。抗体与酶一样呈现相同类型的底物专一性，并且生成有一定立体化学特性的产物。此外，像酶一样，催化抗体可被与抗体结合的化合物所抑制，但不会发生反应。催化抗体与酶之间的相似性还在于它们都具有与过渡状态相结合的能力，它们的催化机理通常都很相似，例如，抗体和有催化活性结构的丝氨酸蛋白酶的 X 射线结构显示其活性区含有丝氨酸和组氨酸残基，它们在空间的排列与这两种残基在丝氨酸蛋白酶中极其相似(图 11-24)。

抗体的催化性能似乎是无限的，事实上，即使某种反应没有特定的酶可以催化时，我们也可以设计出特定的免疫化合物来产生抗体进行催化。这类反应，例如在有机合成中非常重要的 Diels-Alder 反应，其最简单的例子是 1，3-丁二烯与乙烯反应生成环己烯。





像酶一样，抗体在有辅基协助时可以催化更广范围的反应。底物-辅基配合物(如免疫体)作为抗原，通过共价键使辅基与抗体相连，或通过 DNA 重组技术控制辅基结合点，例如，与金属离子相连的三个组氨酸残基，就可以使辅基结合点恰好位于抗原结合点上。

催化抗体的潜在应用包括复杂的化学转移催化和极特殊的肽酶的生产，它们能用于生成蛋白质，其控制机理与内切核酸酶对核酸的控制相似(见节 3-4A)。抗体催化剂比传统的酶催化剂具有的优势在于它的产生速度相对较快(单克隆抗体在几周之内就可以得到)。另一个优势在于由于所有的抗体蛋白在本质上是相类似的，在细菌表达系统中可以用一个标准的方法来合成及纯化它们。

***N*-乙酰胞壁酸**（*N*-acetylmnramic acid, NAM 或 MurNAc）和 ***N*-乙酰葡萄糖胺**（*N*-acetylglucosamine, NAG 或 GlcNAc）之间的键(图 11-14 和节 8-3B)。它同样可水解多聚(NAG)(几丁质，节 8-2B)中的 β(1→4)键，它们是大部分菌体细胞壁和昆虫及甲壳类动物外壳的主要组成部分。溶菌酶主要出现在细胞及脊椎动物的分泌物中，起到杀菌或清除被其他方法杀死的细菌的作用。

鸡蛋白(HEW)溶菌酶是研究最广泛的一类溶菌酶，其作用机理也是研究得最透彻的溶菌酶之一。它是一种极小的蛋白质(14.6kDa)，单肽链，有 129 个氨基酸残基，内部有 4 个二硫键交联。溶菌酶催化底物的水解比非催化反应快 10^8 倍。

A. 酶的结构

由 David Phillips 在 1965 年阐明了 HEW 溶菌酶的 X 射线结构，其中显示蛋白质分子是一个 30Å×30Å×45Å 的近似椭球体(图 11-15)。*其最醒目的标志是一个突出的裂缝，即底物结合位点，横跨分子的一面。*多肽链形成 5 个螺旋片段和构成结合裂缝一壁的三个反平行 β 折叠(图 11-15b)。正如所料，大多数非极性侧链都在分子内部，并不与水溶液发生接触。

302

对于酶作用机理的阐述需要对酶-底物复合物的结构有所了解。这是因为为了了解酶如何作用，除了通过化学或物理的方法确定活性区的残基，还必须了解它们相对于底物以及它们之间

框 11-3 生物化学相关内容

用 X 射线晶体学来观察酶的作用

用 X 射线衍射方法可以在某种程度上研究催化作用发生时的原子重排，因为蛋白质晶体大部分都是溶剂，不仅能够观测到保存在结晶状态中的天然蛋白质结构，而且完整无缺的保留了它们的催化功能。底物可以通过晶体中的溶剂通道，扩散到酶的活性区。然而，在酶催化反应及释放出产物之前，酶只能瞬时地与底物结合。由于这个原因，酶催化反应时的化学变化只能在结合之前或者之后才能观测到，也就是说，只能观测到没有底物时的酶的结构或在有些情况下酶与底物松散结合的结构，有几种方法可以用来解决这个问题。

酶与缓慢反应底物配合物的结构是可以被测定的。在这种方法中，底物必须与酶牢固地结合一天或更长的时间，结合时间必须超过通常测定 X 射线衍射强度所需的时间。另一种方法是使用一种不反应的底物类似物，在这种情况下，分子像底物一样进行结合，但不能被催化发生反应。然而这种方法产生的信息是稍微不完整的，这是因为一些允许催化进行的分子相互作用已经消失或改变了。然而这些数据以及关于非酶反应机理的知识通常可以使得酶作用机理能够在某种程度上被推导出来。事实上，我们现在对于酶－底物作用的知识大部分都是以这种技术为基础的。

像所有的化学反应一样，酶反应对温度也很敏感，因此冷却一个结晶的酶将大大降低它与底物的反应速率。例如，将一个晶体冷却到 40 K 以下，可以使反应时间从不到 1 微秒延长到数小时或几天，这个时间足够测定一套 X 射线衍射数据。

成功用于研究肌红蛋白血红素基团中原子变化的另一种方法解决了在快速分析生化反应时的两个内在问题。第一，与传统的照相技术类似，为了快速摄取(snapshot)酶作用的瞬间，就需要一个极短的曝光时间，这样就必须要使用一种极强的辐射，极强的 X 射线光束由同步加速器产生，这是一种“原子碰撞机”，在其中电子沿圆形轨道被加速到接近光速，从而释放出很强的 X 射线，这种射线的强度比传统的 X 射线发生器所产生的射线要强许多倍。第二，晶体中的所有分子必须同时作用，否则数据就会“模糊”。在研究从肌红蛋白中解离的 CO 时(CO 与肌红蛋白结合的方式与 O_2 相同，但要牢固的多)，分子通过延时仅为几纳秒的激光的照射以后就从血红素上脱离了下来，接下来 CO 通过运动和肌红蛋白再结合，其反应时间在毫秒到微秒级之间。稍做改进后，这种在实验上非常复杂的技术为证明通常在几纳秒之内完成酶作用的催化循环最终提供了有用的证据。

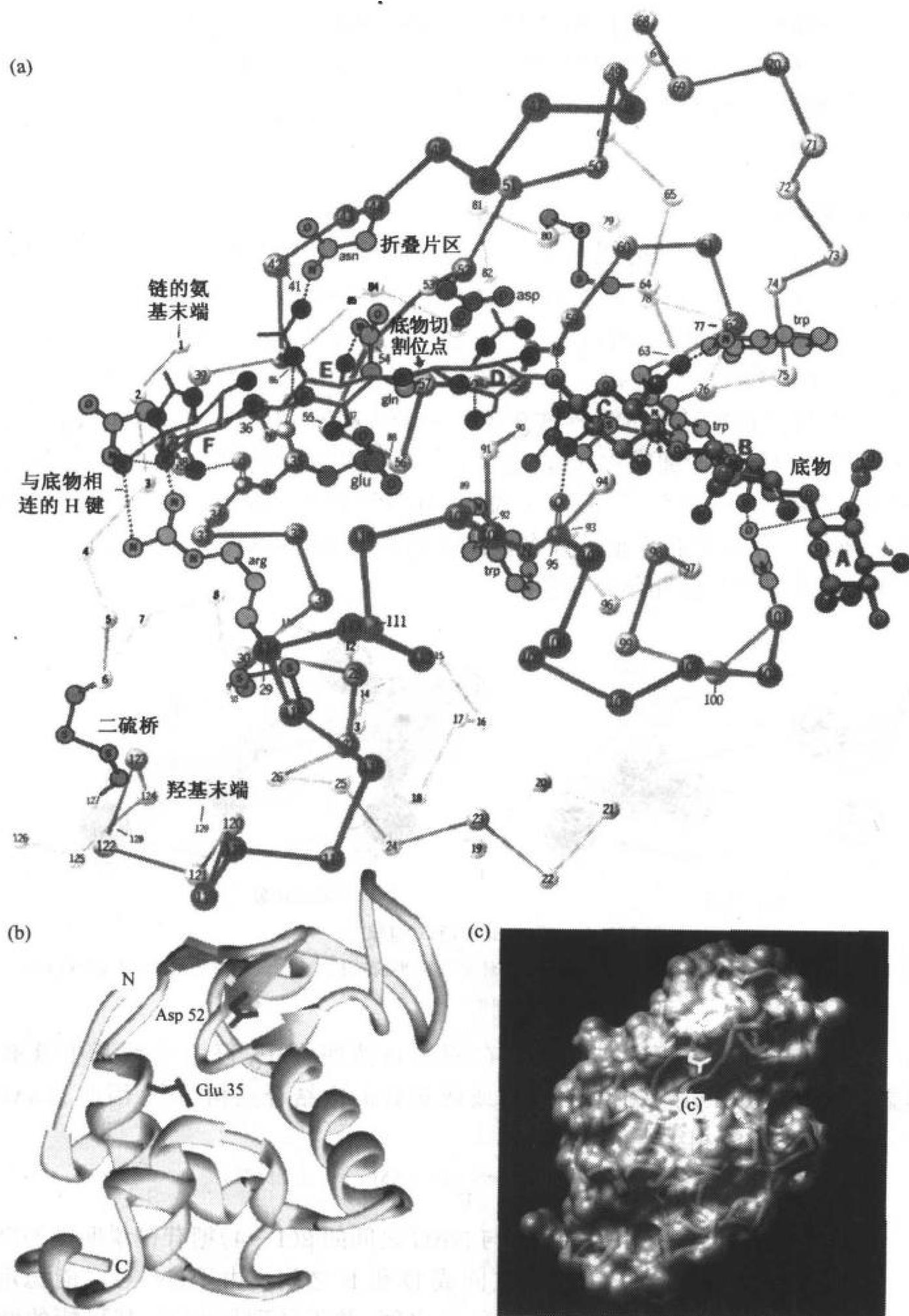


图 11-15 HEW 溶菌酶的 X 射线衍射结构

(a) 与 $(NAG)_6$(绿色)结合的多肽链。图中指示出骨架 C_α 原子的位置及与底物结合区有关的侧链基团和形成的二硫键。底物的糖环标记为从 A[非还原端(右)]到 F[还原端(左)]。溶菌酶催化降解残基 D 和 E 之间的糖键。在溶菌酶与$(NAG)_3$ 的复合物的 X 射线衍射结构中观察到的环 A、B 和 C;D、E 和 F 环的位置是从建模研究中推断出来的。(引自 Irving Geis。)(b)溶菌酶的飘带形式突出表示出蛋白的二级结构,同时表示出其催化作用的重要侧链位置。(c)计算机生成的模型显示蛋白分子包层(紫色)和 C_α 骨架(蓝色)。催化残基侧链 Asp52(上)和 Glu35(下)用黄色表示,请注意酶的底物结合裂缝。(引自 Arthur Olson, The Scripps Research Institute, LaJolla, California) a,b 和 c 具有大致相同的取向。

的三维排列。然而酶在催化反应及释放产物之前，仅仅是与其好的底物进行瞬间的结合。这样我们对于酶-底物复合物的绝大部分知识都来自于在复合物中有抑制剂或不良底物存在时酶的X射线研究，这种不良底物与酶相结合的时间大于用X-射线衍射测量蛋白质晶体所需要的一天或更长的时间(见框11-3)。

通过构建模型可测定溶菌酶催化区

X射线结构分析揭示了能被溶菌酶缓慢水解的三聚糖$(NAG)_3$与酶结合的位点相当于残基A、B、C在酶中所占据的位置(图11-15a)，Phillips用建模的方法研究了一个大的底物如何与酶相结合。溶菌酶的活性区隙口分布很长，可以容纳一个多糖的6个残基，在图11-15中标记为A～F。但第四个残基似乎不能与酶结合，因为C6和O6原子与蛋白质侧链和残基C靠得过于近，通过葡萄糖环从其通常的椅式构象转换成半椅式构象可以减少这种空间位阻(图11-16)。这种使得残基D的C1、C2、C5和O5共平面发生扭曲，将C6基团从其通常的直立键移动到平伏键，这样C6基团就和残基C离开了一定距离，减小了位阻，并且可以与Gln57主链上的羰基形成氢键。Phillips还发现残基E和F无扭曲地以许多氢键和范德华力与酶相结合，在图11-17中表示了6个底物糖类残基通过氢键与酶相结合的情况。

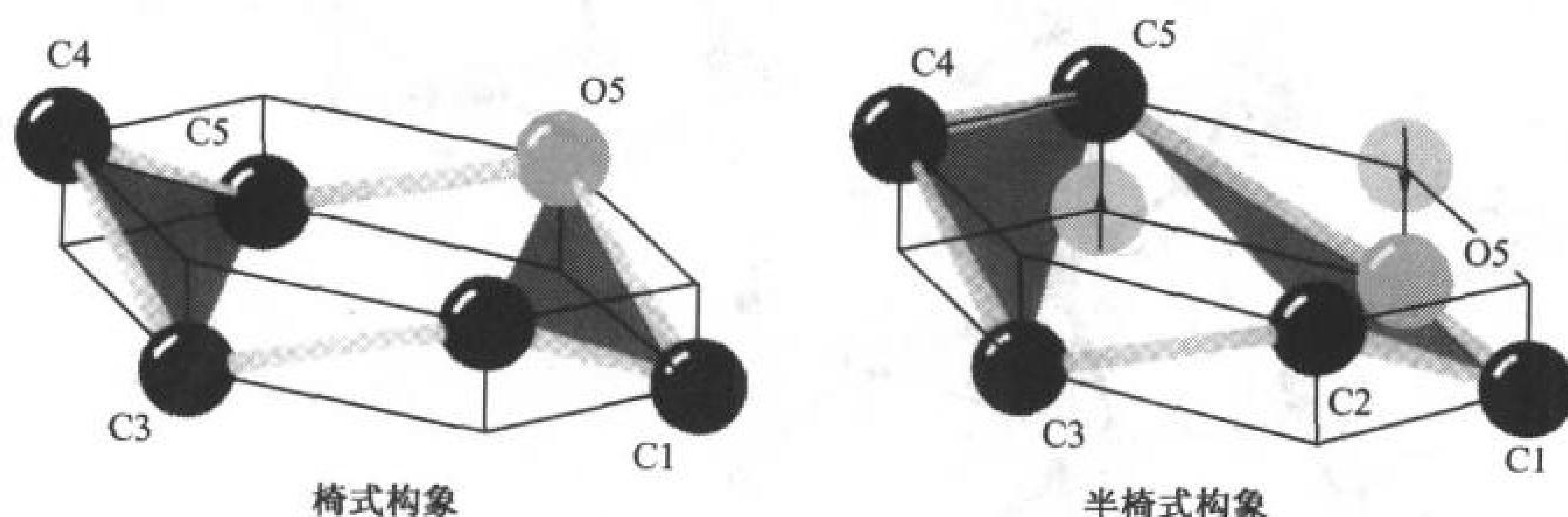
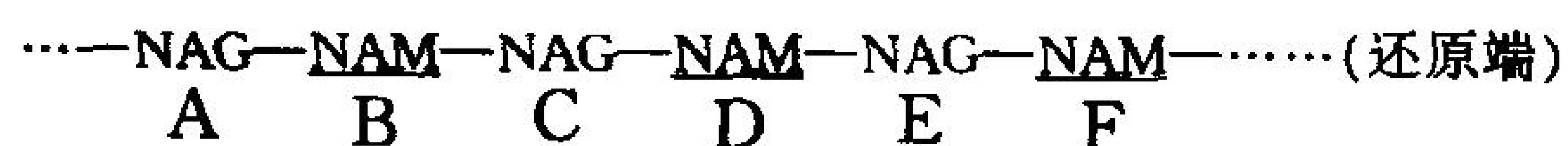
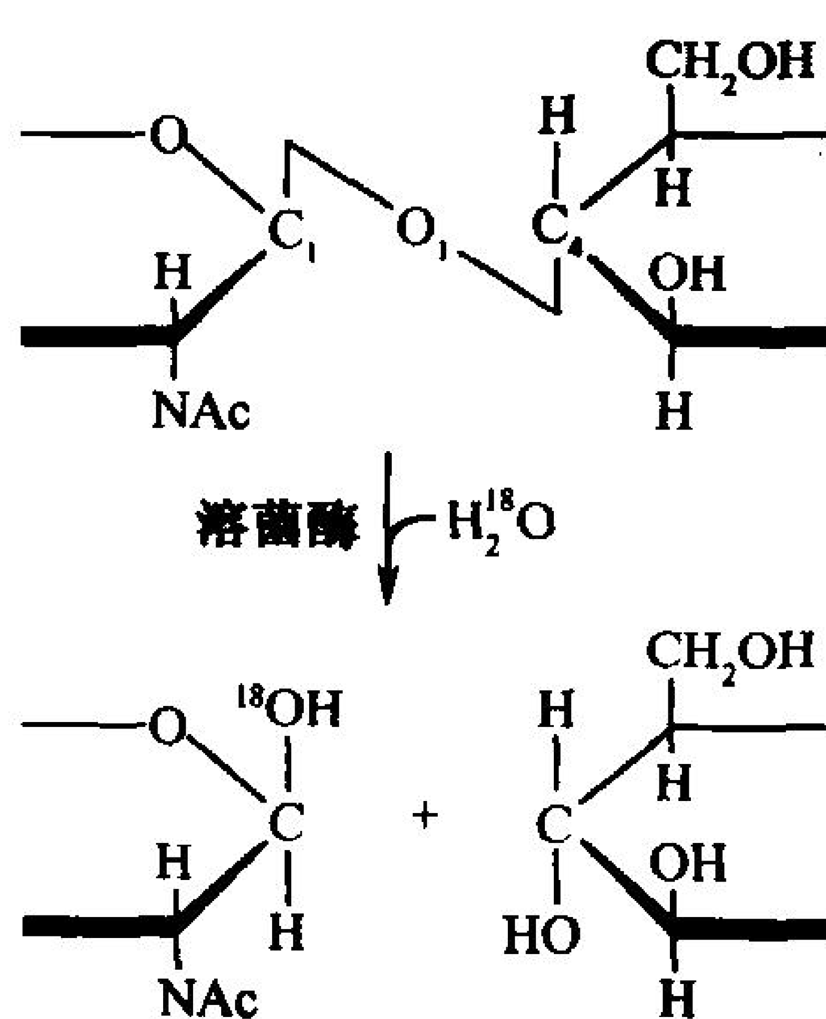


图11-16 椅式和半椅式构象

已糖环通常呈现椅式构象。然而，可以假定溶菌酶使D环变形成半椅式构象，在该构象中，C1、C2、C5和O5是共平面的。

我们已经几乎可以确定溶菌酶的催化区。在酶的自然底物中，每两个残基中就有一个NAM，但是模型显示乳酸基(lactyl)不能与残基C或残基E的次结合点相结合，因此NAM残基必须在次结合点B、D、F上与酶相结合。





溶菌酶水解NAM与NAG之间的β(1→4)糖苷键说明键的断裂发生在残基B和C之间或D和E之间。由于$(NAG)_3$能稳定地与酶结合在结合区B和C之间，并不被酶所断裂，其可能的断裂点应在残基D和E之间。正如我们所料，如果酶有6个与糖的次结合点，且在次结合点D和E之间分裂它所结合的底物的话，则溶菌酶几乎能定量地从它的还原端(有C1—OH的一端)水解第二和第三残基之间的$(NAG)_6$键。

通过研究在$H_2{}^{18}O$中溶菌酶催化水解$(NAG)_3$的反应可确定溶菌酶所断裂的键。产物中有与新释放的还原端的C1原子相连的^{18}O键，这就证实了键的断裂存在于C1和O1之间：

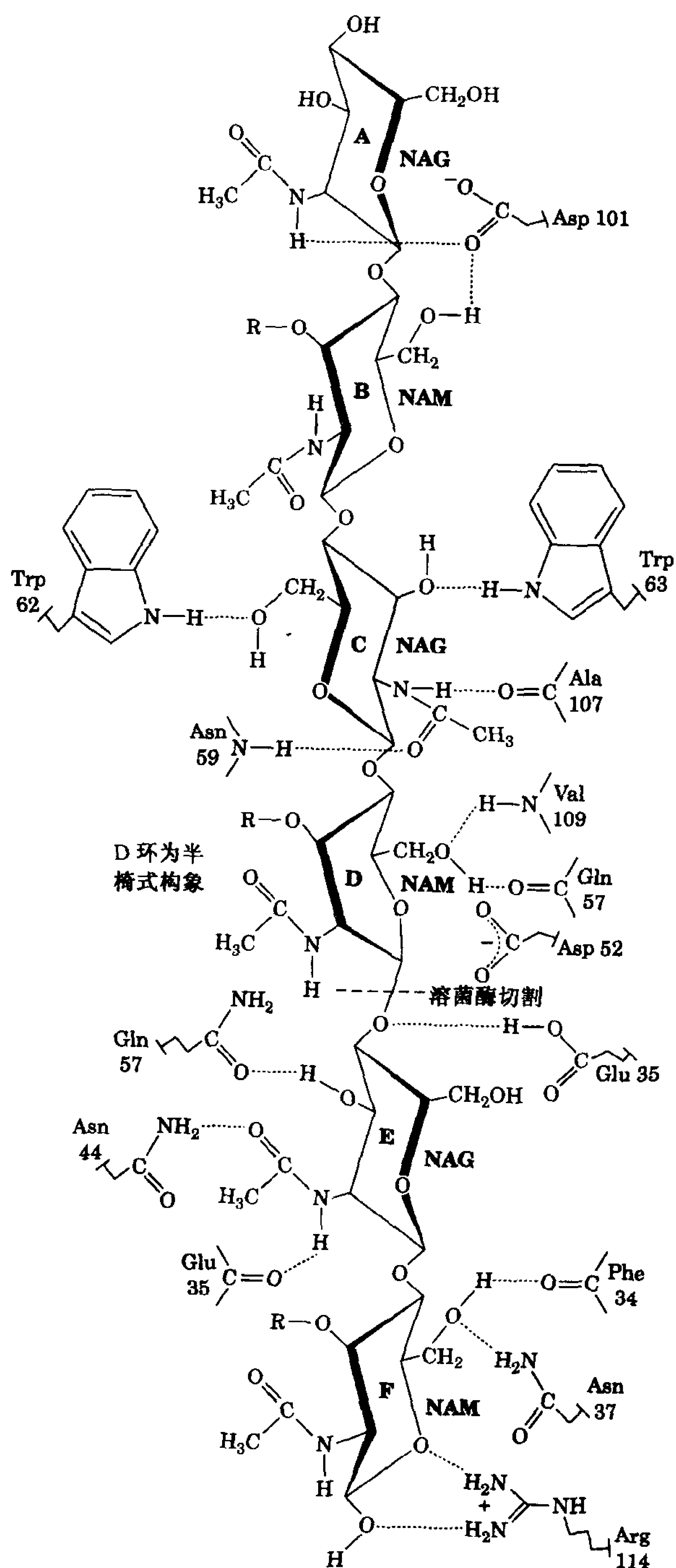


图 11-17 溶菌酶与其底物的相互作用

该视角进入酶的结合缝进行观察，环的较重的一边面向酶的外侧，轻的一边对着裂缝的底部。(引自 Irving Geis)

溶菌酶催化水解所结合底物 D 残基的 C1—O1 键，此外，该反应可以保持构型，因此产物 D 环仍然保持 β 异头物(anomer)构型。

B. 催化机理

我们还需要确定溶菌酶的催化基团，由溶菌酶所催化的糖苷水解反应是从缩醛(acetal)转化为半缩醛。非酶催化的缩醛反应是一个酸催化的反应，它包括试剂氧原子的质子化，及其 C—O 键的断裂(图 11-18)。这样会形成共振稳定的碳正离子构型，称做**氧鎓离子**(oxonium ion)。为了达到这种共振稳定的结构，水合氢离子中的 R 和 R′基团必须与它的 C、O 和 H 原子共平面。然后水加到水合氢离子上，生成半缩醛，经酸催化剂得到再生。为了找到这种催化缩醛水解反应的酶的催化基团，我们必须找到一种潜在的酸催化剂，以及可以进一步稳定水合氢离子中间体的基团。

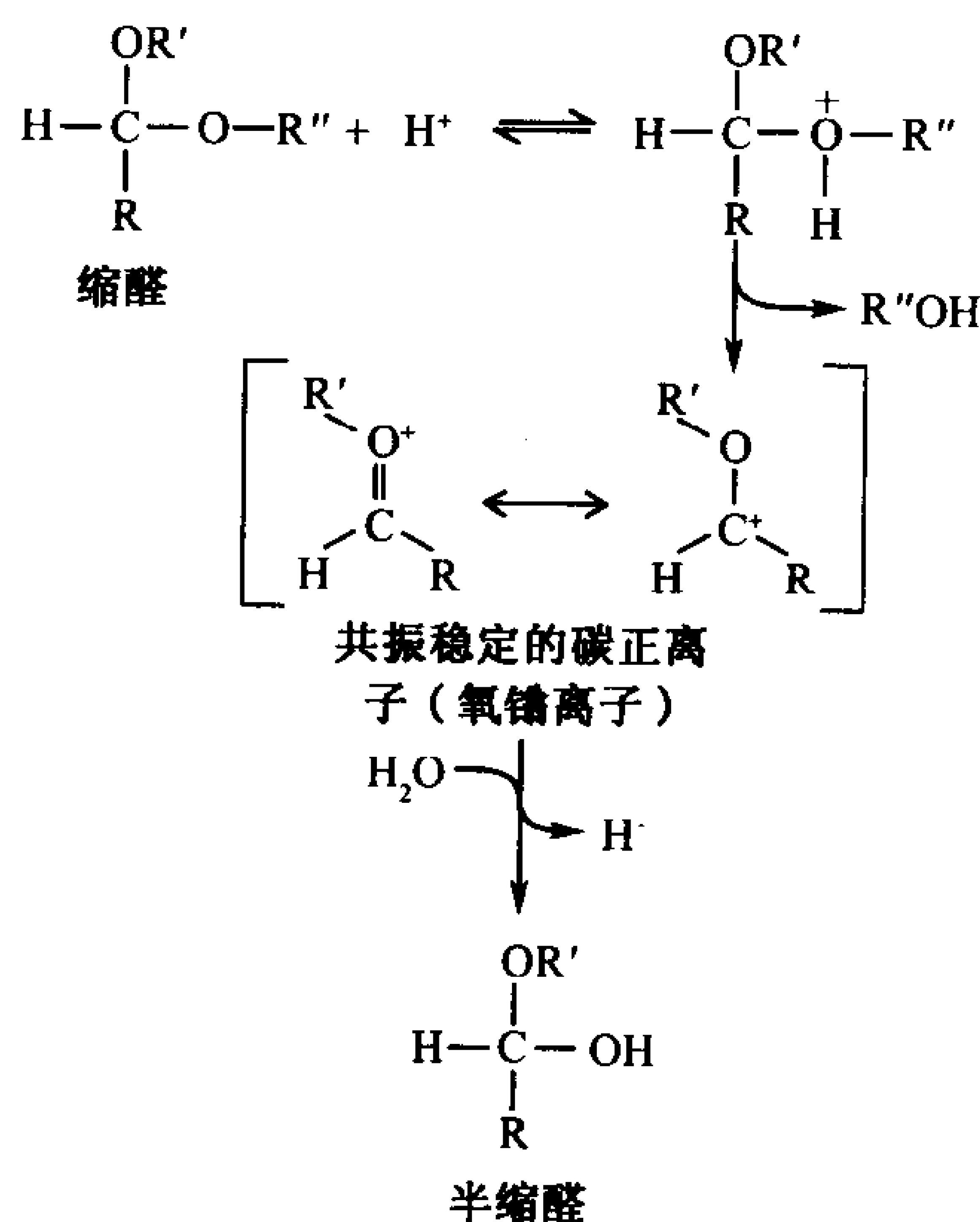


图 11-18 从缩醛转化为半缩醛的非酶酸催化水解机理

该反应涉及到缩醛的一个氧原子的质子化，接着 C—O 键断裂形成醇(R″OH)和一个共振稳定的碳正离子(氧鎓离子)，水与氧鎓离子的加成形成半缩醛和再生氢离子催化剂。注意水合氢离子的 C、O、H、R 和 R′原子均在同一个平面。

Glu 35 和 Asp 52 是溶菌酶的催化残基

在溶菌酶反应中心附近具有所要求的催化性质的惟一官能团是 Glu 35 和 Asp 52 的侧链，这些侧链处于即将断裂的糖苷键的任意一侧，二者所处的环境有显著的不同(图 11-15)。Asp 52 周围围绕着几个保守的极性残基，它与它们形成一个氢键复合物网。因此 Asp 52 被认为有一个正常的 p*K* 值，也就是说它应该被去质子化，从而在溶菌酶具有催化活性的 pH 为 3～8 的范围内带负电。与此相反，Glu 35 的羧基处于一个非极性的环境中，在相当高的 pH 值时仍处于质子化状态。Asp 52 和 Glu 35 的羧基氧原子距残基 D 的 C1—O1 键约 3Å，这使得它们分别适于作静电催化剂和酸催化剂。用蛋白修饰试剂和定向诱变方法进行的其他研究证明这些残基具有很重要的催化作用。

305

Phillips 机理

根据上述资料，Phillips 对于溶菌酶的酶催化机理做了如下阐述(图 11-19)：

1) 溶菌酶通过与六糖单位相结合而与细菌细胞壁连接，在这个过程中，为了解决—C6H_2OH 基团与蛋白质之间的不良结合，残基 D 被扭曲成半椅式构象。

2) Glu 35 将其质子转移给 D 环上惟一与其相邻的极性基团 O1(这是通常的酸催化机理)。随后 C1—O1 键断裂，在 C1 上生成共振稳定的水合氢离子。

3) 通过电荷-电荷作用，Asp 52 上离子化的羧基稳定了水合氢离子(静电催化作用)。这种羧酸盐基团不能和底物形成共价键，因为 C1 和 Asp 52 的羰基 O 原子之间的最小距离 3.0Å 比 C—O 共价键的键长 1.5Å 大很多。事实上一些溶菌酶并不含这种酸性残基，扭曲为平面的半椅式构象产生的 D 环上的张力有利于键的断裂反应，这是水合氢离子要求平面性的结果。也就是说，D 环最初的构象与反应过渡态的构象相似(过渡态最佳结合催化机理；图 11-20)。

4) 酶释放水解的 E 环与附着的多糖，产生一个酶稳定的水合氢离子。该中间产物随后在逆反应过程中与来自溶液的 H_2O 加成生成产物和重新质子化的 Glu 35。酶的裂缝保护水合氢离子，使水分子只能从侧面进攻而不改变构象。酶随后释放出 D 环产物及其附着的糖，最后完成催化循环。

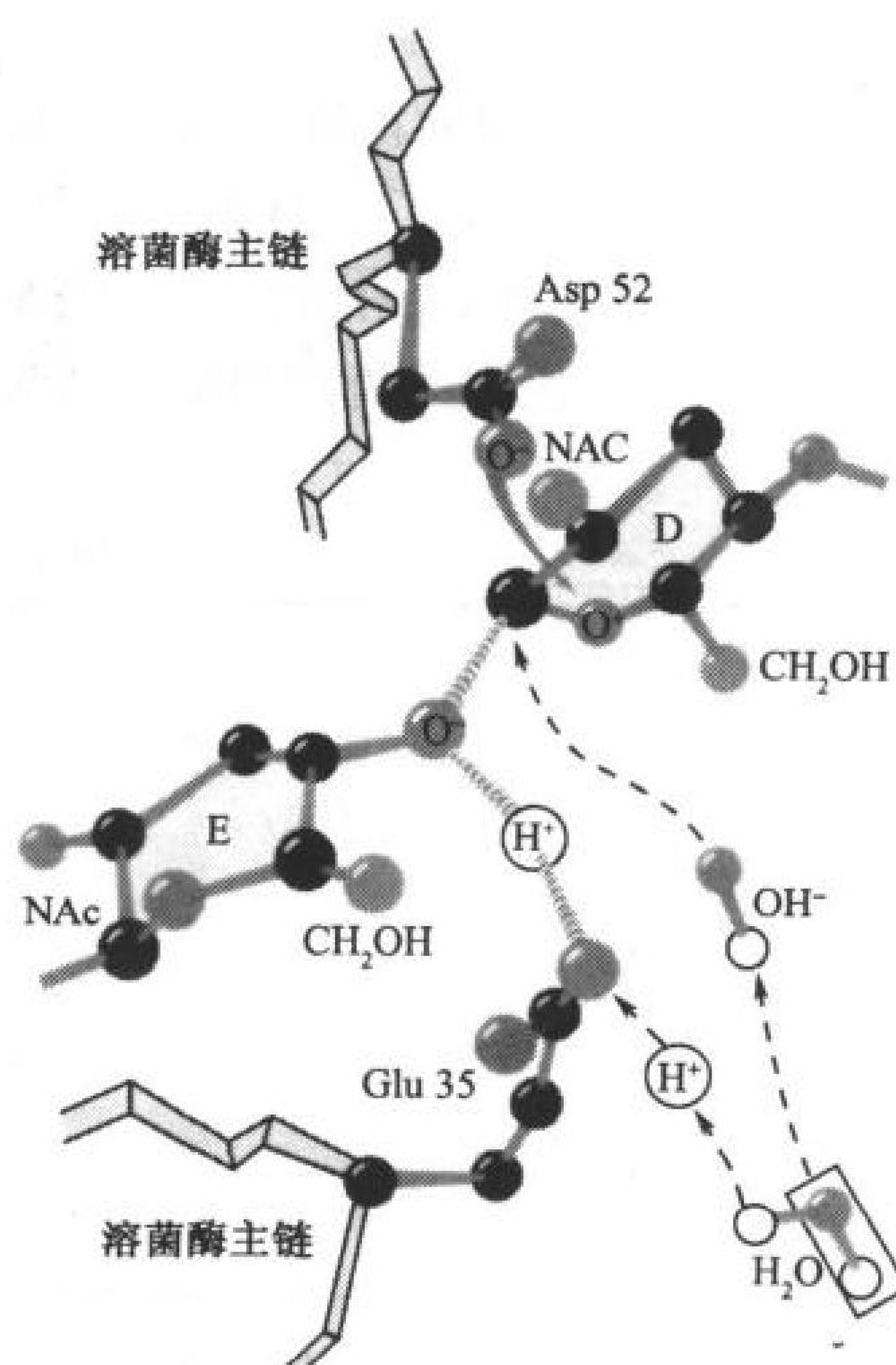
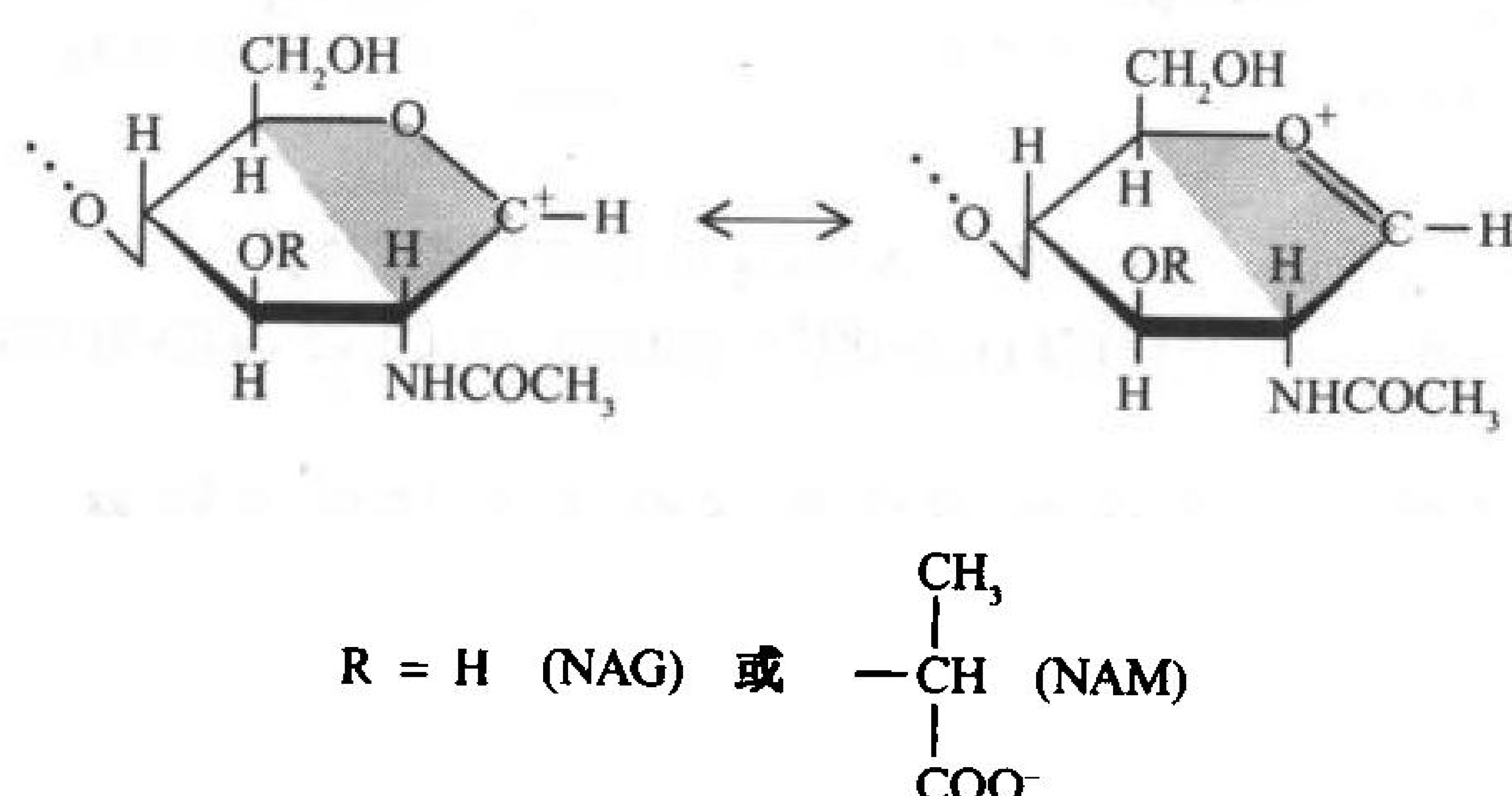


图 11-19　功能的秘诀：溶菌酶反应的 Phillips 机理

通过 Glu 35 桥氧原子的质子化引起了底物 D 和 E 环间糖键的断裂。Asp 52 羧酸基团的靠近和酶诱导 D 环变形稳定了生成的 D 环水合氢离子。一旦 E 环被释放，来自于溶液的 H_2O 提供一个 OH^- 与水合氢离子结合，并提供一个 H^+ 使 Glu 35 再质子化。NAc 代表每个糖环 C2 上的 *N*-乙酰胺基取代基。



$$R = H\ (NAG)\ 或\ -\underset{COO^-}{\overset{CH_3}{CH}}\ (NAM)$$

图 11-20　溶菌酶作用的过渡态

D 环水合氢离子形式因共振而稳定。这要求原子 C1、C2、C5 和 O5 共平面(阴影部分)；即己糖必须呈现半椅式构象。

306

张力的作用

许多对溶菌酶的机械学的研究对建立的张力催化作用却难以理解。不同寡糖与溶菌酶结合平衡的测量表明,除了与D亚位点结合的糖残基外,所有糖残基都对底物与溶菌酶结合起积极的作用;仅仅在D亚位点结合的NAM需要输入自由能(表11-4)。Phillips机理解释了该现象是因为将D环从优先的椅式构象拉伸为半椅式的能量上的需要。

表 11-4 HEW 溶菌酶亚位点结合自由能

位置	结合的糖	结合自由能/(kJ·mol⁻¹)
A	NAG	-7.5
B	NAM	-12.3
C	NAG	-23.8
D	NAM	+12.1
E	NAG	-7.1
F	NAM	-7.1

引自 Chipman, D.M. and sharon, N., Science 165, 459(1969)。

抑制剂的实验同样支持了Phillips机理。正如我们在节11-3F中的讨论一样,与过渡态优先结合催化反应的酶和具有与过渡态几何形状类似的抑制剂(过渡态模拟物)结合的亲和性大于酶与底物结合的亲和性。$(NAG)_4$的δ-内酯类似物(图11-21)是溶菌酶的过渡态类似物,因为该化合物的内酯环具有半椅式构象,这在几何上类似于底物D环的水合氢离子过渡态。与预料的相一致,通过X射线研究表明,抑制剂结合到溶菌酶的A-B-C-D亚位点,其内酯环以半椅式构象结合到D亚位点。

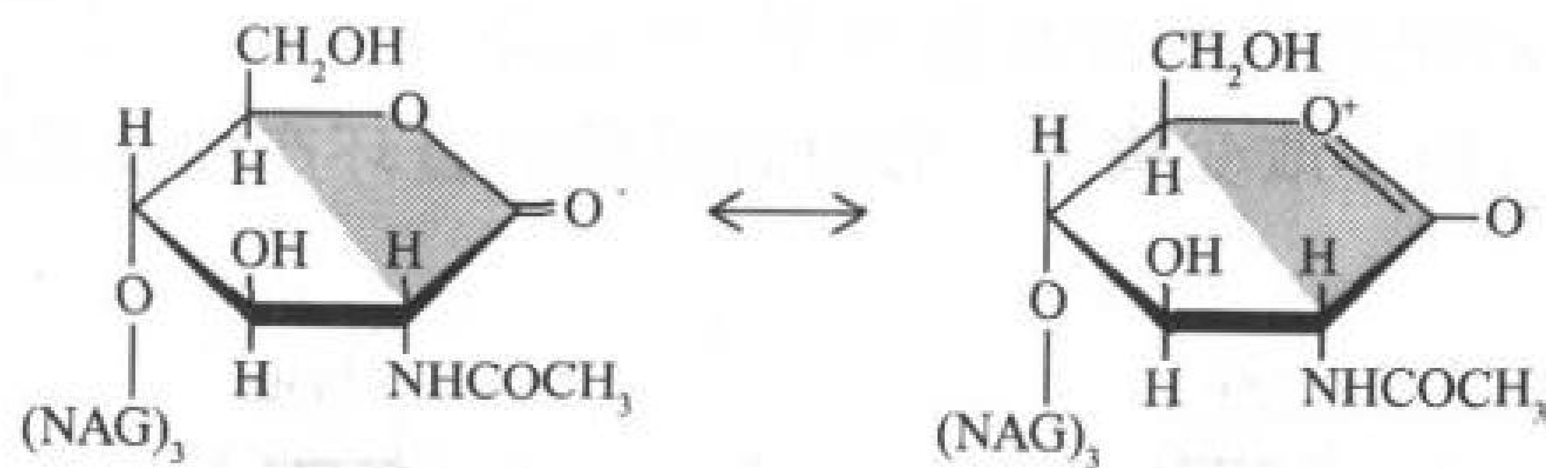
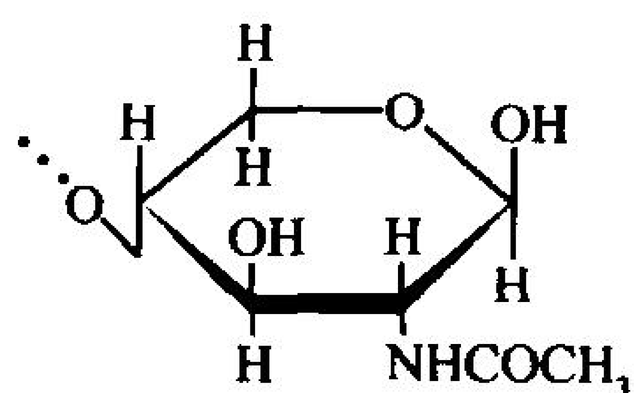


图 11-21 $(NAG)_4$ 的 δ-内酯类似物

正如溶菌酶反应过渡态中的D环一样(与图11-20比较),它的C1、O1、C2、C5和O5原子因共振而共平面(阴影)。

尽管如此,在溶菌酶催化中底物变形所扮演的角色仍值得怀疑。Michael Levitt 和 Arieh Warshel所作的有关溶菌酶与底物的理论研究指出,蛋白质太柔软而无法使结合底物的D环作机械变形。实际上,Nathan Sharon和David Chipman测定NAG内酯抑制剂(图11-21)与D亚位点的结合能仅仅比NAG多9.2 kJ·mol⁻¹。正如节11-3F中的解释一样,作为张力所造成的影响,这样数量的能量对应于溶菌酶速率的提高不会超过约40倍(回想一下,过渡态模拟物和底物间结合能的差别是来自过渡态优先结合的酶速率的提高)。这样数量的提高很难构成溶菌酶约10^8倍速率增加的主要部分(仅仅造成约20%的反应$\Delta\Delta G_{cat}^{\ddagger}$)。此外,一个 ***N*-乙酰木糖胺**



N-乙酰木糖胺残基

(N-acetylxylosamine, XylNAc)残基,缺乏立体阻碍的 NAM 和 NAG 的 C6H$_2$OH 基团,与 NAG 相比仅仅只有边上的无关紧要的更强的结合亲合力。然而,Phillips 机理的假设是,由该 C6H$_2$OH 基团引起的不利接触导致了 D 环的变形。

Michael James 测定的溶菌酶与 NAM-NAG-NAM 复合物的 X 射线衍射结果,使得在前述实验观察中出现的表面不一致得到了很大的合理化。正如预期所料,此三糖与溶菌酶的 B、C 和 D 亚位点结合。与 Phillips 机理一致,在 D 亚位点的 NAM 变形为半椅式构象,其 C6H$_2$OH 基团因为空间位阻位于几乎直立位置,与 C 亚位点结合的 NAG 则为乙酰胺基。这样的紧张构象通过 D 环 O6 与骨架 Val 109 的 NH 间的强氢键而得以稳定(过渡态稳定性)。实际上,Val 109 突变为 Pro 以后,因缺乏 NH 基难以形成氢键而使酶失活。

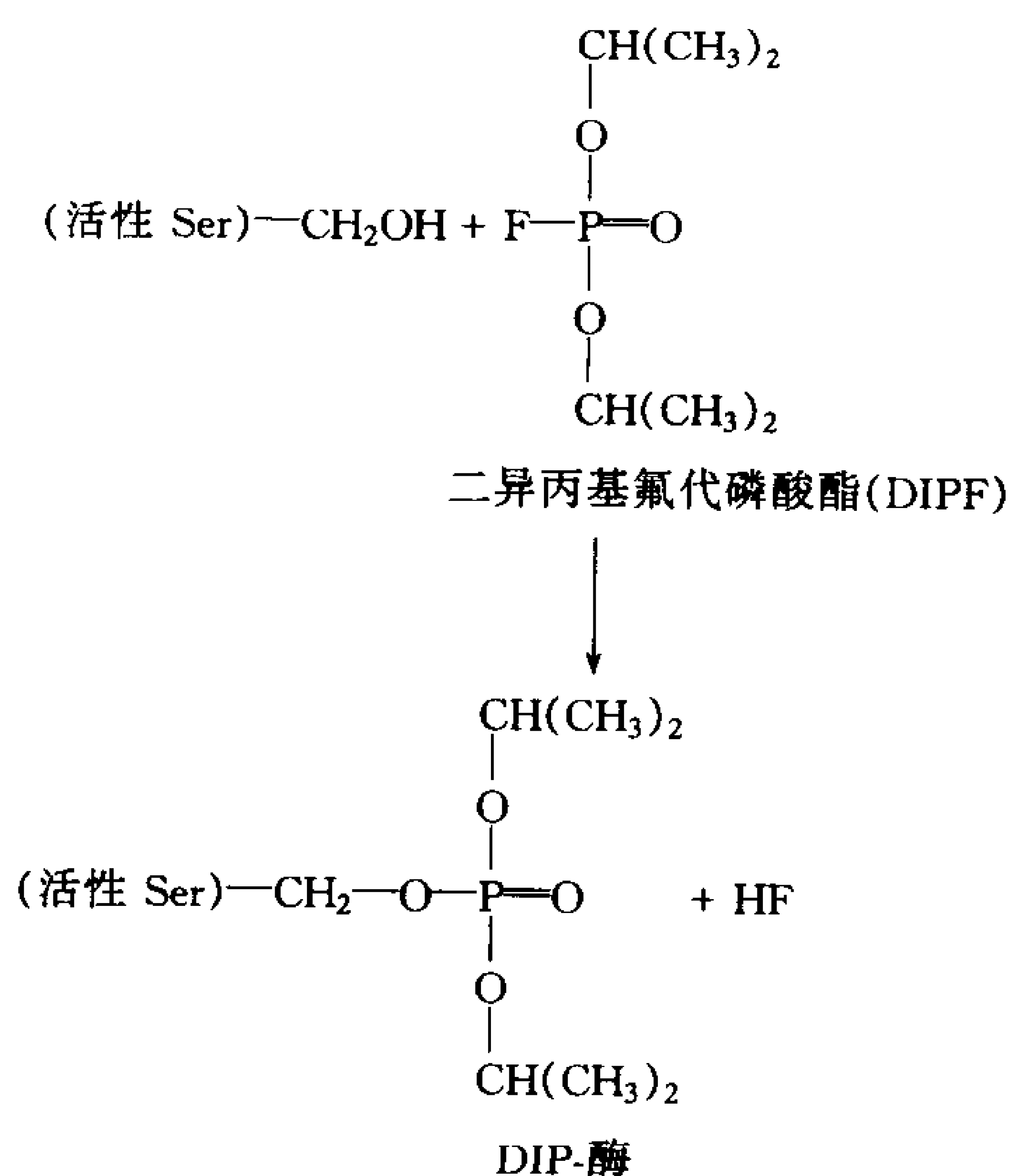
NAG、NAG 内酯和 XylNAc 与 D 环亚位点结合的没有预料的微小自由能差别,可以通过它们不是 D 位点正常的占据者和无需张力就能结合来进行解释。NAM 作为 D 位点正常的占据者,有一个体积巨大的乳酸基侧链妨碍它以非张力的方式结合。最后,Glu 35 的一个羧基 O 与 D 位点上的 NAM 的 O1 形成强氢键,毫无疑问它促进了 Phillips 机理中的质子转移步骤。因此,Phillips 机理看起来是正确的。

5. 丝氨酸蛋白酶

下一个酶催化机理的例子是被称之为**丝氨酸蛋白酶**(serine protease)的一类有多种变化和广泛分布的蛋白水解酶类。所以这样命名也是因为它们通常的催化机理中涉及到一个特殊的活性丝氨酸残基。丝氨酸蛋白酶包括来自于原核生物和真核生物的消化酶,也包括一些参与到发育、血液凝固、炎症和大量的其他过程中的特定蛋白。在本节中,我们着眼于几种已得到很好研究的丝氨酸蛋白酶:胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和弹性蛋白酶。

A. 活性中心

胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和弹性蛋白酶是由胰腺合成并分泌进入十二指肠(小肠的上端部分)的消化酶。所有这些酶都是催化肽(酰胺)键水解的,但对侧链基团待断裂(将被切割)的肽键水解具有不同的特异性。胰凝乳蛋白酶特定催化的待断裂键前有一个庞大的疏水基团,胰蛋白酶特定催化带正电荷的残基,弹性蛋白酶特定催化一个小的中性基团(表 5-5)。它们共同组成一个有效的消化组。

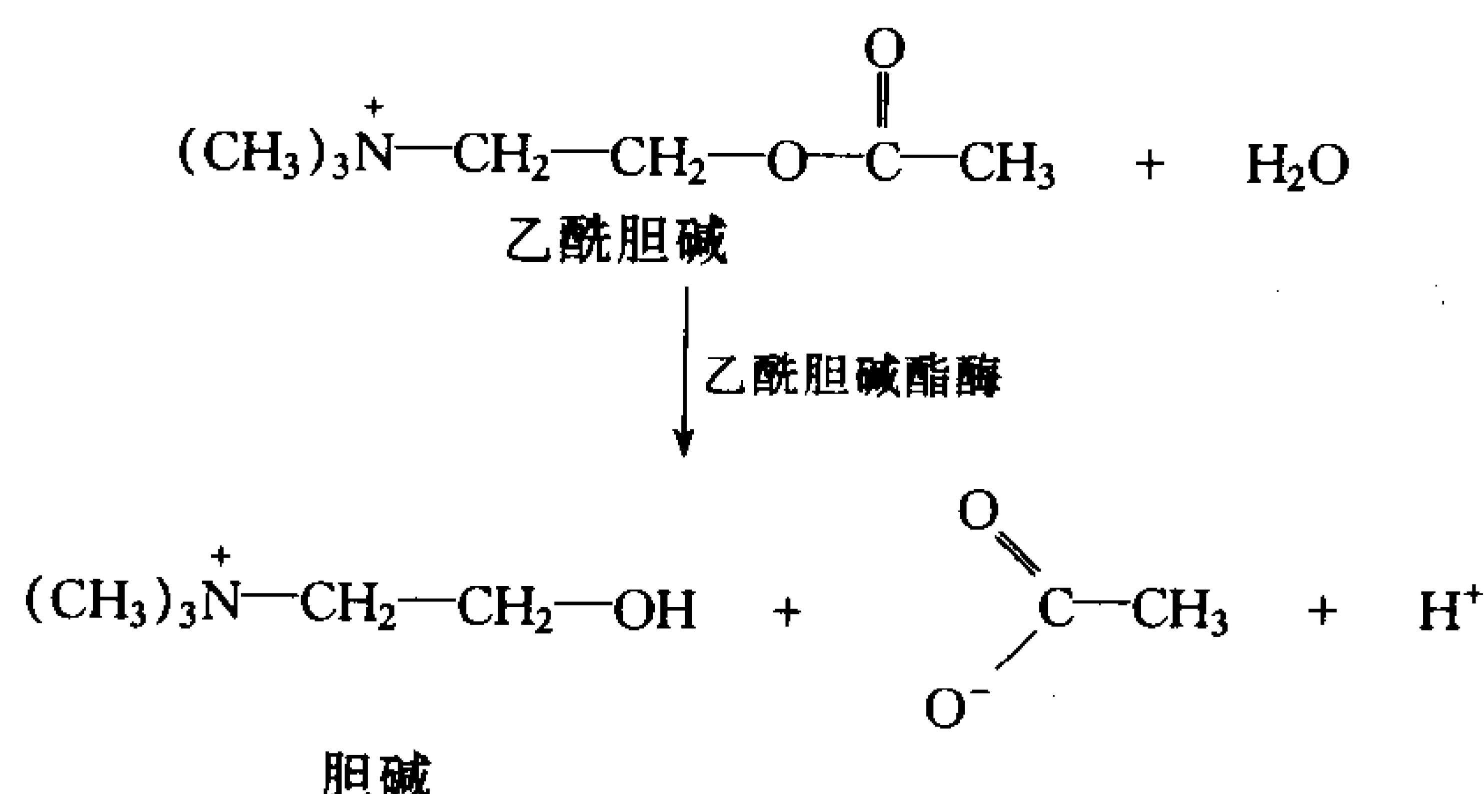


通过化学标记研究已确定胰凝乳蛋白酶的催化基团。分析丝氨酸蛋白酶中活性区 Ser 的存在的一个测试是它与**二异丙基氟代磷酸酯**(DIPF)的反应,它使该酶不可逆地失活(如右图)。其他的丝氨酸残基,包括那些位于同一个蛋白上的丝氨酸残基并不与 DIPF 反应。DIPF 仅仅与胰凝乳蛋白酶的 Ser 195 反应,因此证明

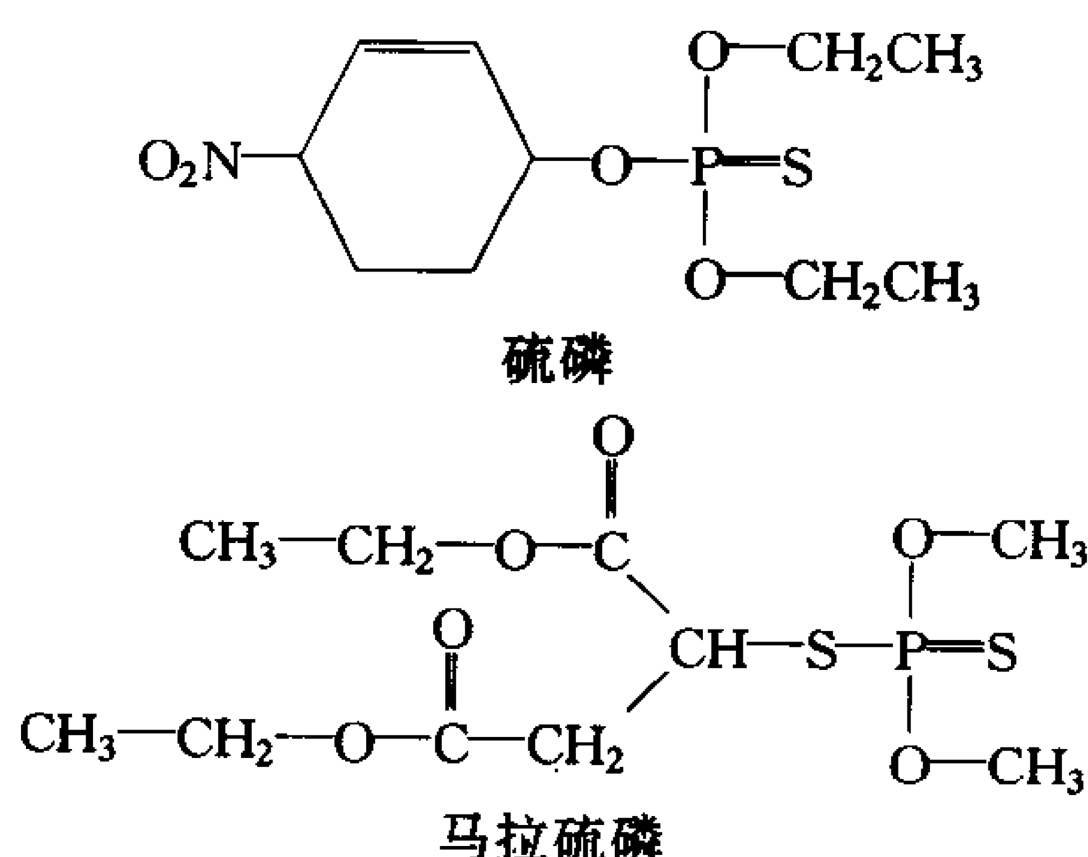
该残基是酶的催化活性区 Ser。该特异性使 DIPF 和其类似物有非常大的毒性(见框 11-4)。

框 11-4 健康和疾病的生物化学

神经毒素

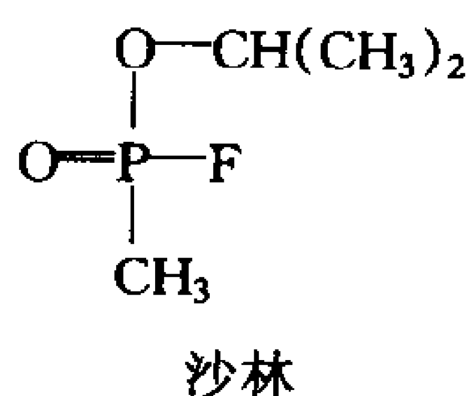


DIPF 作为一种酶失活试剂来自于诸如 DIPF 等有机磷化合物是有效的神经毒素的发现。DIPF 的神经毒性来自于它使**乙酰胆碱酯酶**(acetylcholinesterase)失活的能力,该酶催化**乙酰胆碱**(acetylcholine)的水解。



正如胰凝乳蛋白酶一样(节 11-1B),乙酰胆碱酯酶的酯酶活性需要一个反应活性 Ser 残基。

乙酰胆碱是一种**神经递质**(neurotransmitter):它通过某种**突触**(synapse)(神经细胞间的连接点)传递神经脉冲。在神经突触中乙酰胆碱酯酶正常地降解乙酰胆碱,以使神经脉冲持续仅仅大约一毫秒。乙酰胆碱酯酶的失活阻止神经递质的水解,结果导致作为乙酰胆碱受体的 Na^+-K^+ 通道比正常时要开放更长的时间,因此干扰了神经脉冲的正常顺序。DIPF 对于人是有毒的(因窒息导致死亡),因而军事上作为神经毒气使用。类似化合物包括对**硫磷**(parathion)和**马拉硫磷**(malathion),是有效的杀虫剂,它们对于昆虫的毒性远大于对哺乳动物的毒性。神经毒素诸如 DIPF 和沙林(因 1995 年日本地铁恐怖分子释放沙林毒气而恶名昭著)能使**二乙基对硝基苯磷酸酯酶**(paraoxonase)失活。该酶有两种异构体(一种在192位上是 Arg,另一种则为 Gln),因而有不同的活性,而且随个体差异而具有不同的水平。这些因素可以用来解释大量观察得到的不同个体对神经毒素敏感性的差异。



308

通过**亲和性标记**(affinity labeling)发现了第二个重要的催化活性残基 His 57。在该技术中,一个带有活性基团的底物类似物结合到酶的活性位点上,并与邻近的易感基团形成稳定的共价键,这些具有反应活性的底物类似物被称之为生物化学中的“特洛伊木马”。这些亲和标记基团能随后被鉴定识别。

胰凝乳蛋白酶特异性结合**甲苯磺酰-L-苯丙氨酸氯甲酮**(tosyl-L-phenylalanine chloromethy lketone, TPCK),这是因为它与 Phe 残基类似(胰凝乳蛋白酶首选底物残基之一)。与活性位点

309

结合的 TPCK 的氯甲酮基团是强烷基化试剂;它只与 His 57 反应(图 11-22),因此导致酶的失活。偏向于碱性基团的胰蛋白酶由**对甲苯磺酰-L-赖氨酸氯甲酮**(tosyl-L-lysine chloromethylketone)引起失活。

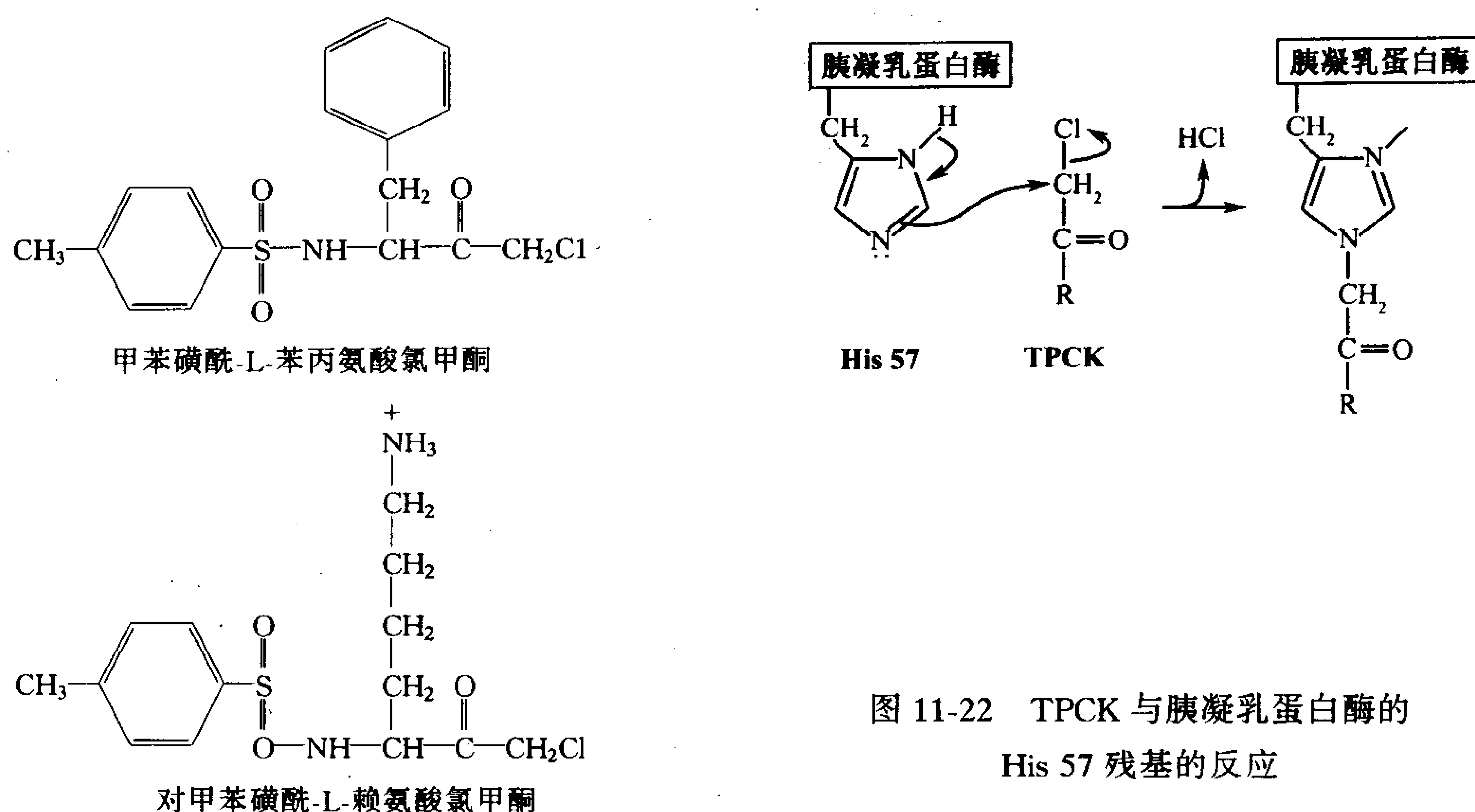


图 11-22　TPCK 与胰凝乳蛋白酶的 His 57 残基的反应

B. X 射线衍射结构

胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和弹性蛋白酶惊人地相似：这些约 240 个残基酶的一级结构有 40%是完全相同的，与此相比，人类血红蛋白的 α 和 β 链只有 44%的结构是相同的。所有这些酶含有一个具有反应活性的 Ser 和一个催化必需的 His。因此它们的 X 射线结构非常相近也就毫不奇怪了。

在 1967 年 David Blow 阐明了牛胰凝乳蛋白酶的结构。随后 Robert Stroud 和 Richard Dickerson 测得牛胰蛋白酶结构(图 11-23)，David Shotton 和 Herman Watson 测得猪弹性蛋白酶的结构。这些蛋白酶中的每一个都折叠成两个结构域，这两部分都有一个延展区域，其中包含一个桶形排列的反平行 β 折叠，并含有少量螺旋。为方便比较这三种酶的结构，我们将使用相同的残基编号系统——**牛胰凝乳蛋白酶原**(chymotry-psinogen)(胰凝乳蛋白酶的 245 残基的前体)编号系统——为其编号(节 11-5D)。

在所有这三种结构中，催化必需的 His 57 和 Ser 195 残基位于酶的底物结合区(图 11-23a)的中心。X 射线衍射结构同样显示在所有丝氨酸蛋白酶中均存在的 Asp102 埋没于一个溶剂难于接近的口袋中。这三个不变的残基构成一个氢键结合群体，所以称为**催化三单元组**(catalytic triad)(图 11-23 和图 11-24)。

311

底物专一性只是部分合理的

上述三种酶的 X 射线衍射结构支持其不同的底物专一性的基础是：

1) 在胰凝乳蛋白酶中，Phe、Trp 或 Tyr 残基的特大的芳香基团有助于待断裂肽键的羰基紧密嵌入催化基团附近的长条形疏水口袋中。
2) 在胰蛋白酶中，对应于胰凝乳蛋白酶 Ser 189 的残基是阴离子残基 Asp、它位于结合口袋背面。因此胰蛋白酶的阳离子侧链残基 Arg 和 Lys 能与 Asp 残基形成离子对。胰凝乳蛋白酶的特异性口袋的其余部分在胰蛋白酶中得到保留，所以它能容纳 Arg 和 Lys 的巨大侧链。

312

3) 之所以称弹性蛋白酶是因为它能快速水解富含 Ala、Gly 和 Val 的几乎不能被消化的**弹性蛋白**(elastin),它们是连接组织的主要组成成分。弹性蛋白酶结合口袋大部分由 Val 和 Thr 残基侧链所占据,它取代了在胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶专一性口袋中的 Gly 残基。所以,弹性蛋白酶的结合位点更像一个洼地,特异性切割小型中性基团后的肽键,特别是 Ala 后的肽键。与此相比,这样的肽键由胰凝乳蛋白酶和胰蛋白酶来水解是非常慢的,因为这些小底物不能足够地固定在酶表面上以产生有效的催化。

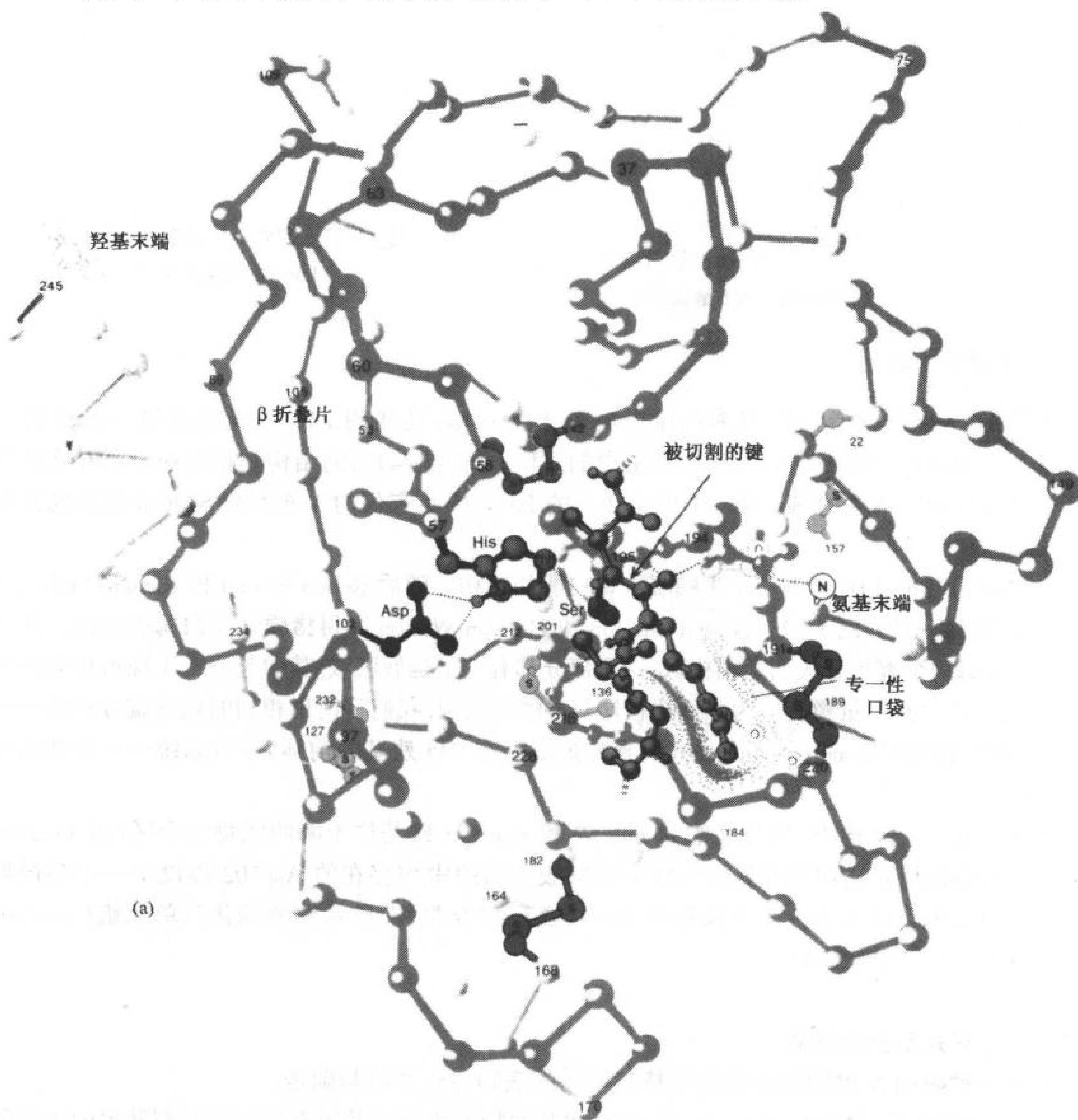
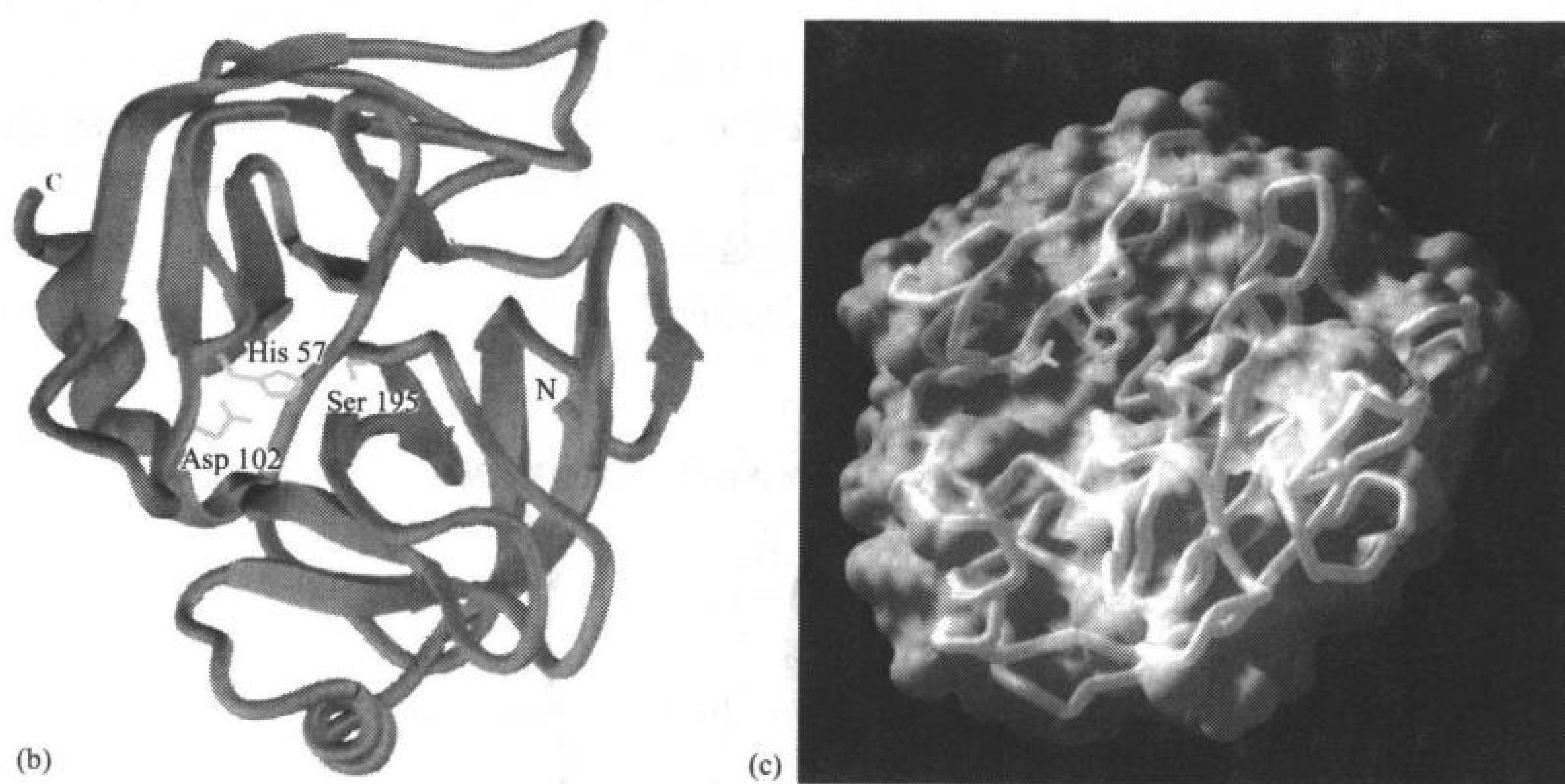


图 11-23　牛胰蛋白酶 X 射线衍射结构

(a) 酶的结构图,图中显示其二硫键(橙色)和催化三单元组侧链,Ser 195(紫色),His 57(蓝色)和 Asp 102(红色)。图示出一个多肽底物(绿色)的 Arg 侧链占据了酶的专一性口袋(点画状)。胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶的催化活性中心包含几乎完全相同排列的催化三单元组。[图由 Irving Geis 提供](b)胰蛋白酶的飘带图,突出显示其二级结构和催化三单元组的排列。(c)计算机生成的图形显示叠加在其多肽骨架(紫色)上的胰蛋白酶表面(蓝色),催化三单元组的侧链用绿色表示。(引自 Arthur Olson, The Scripps Research Institute, La Jolla, California)图 a、b、c 具有相同的取向。



续图 11-23

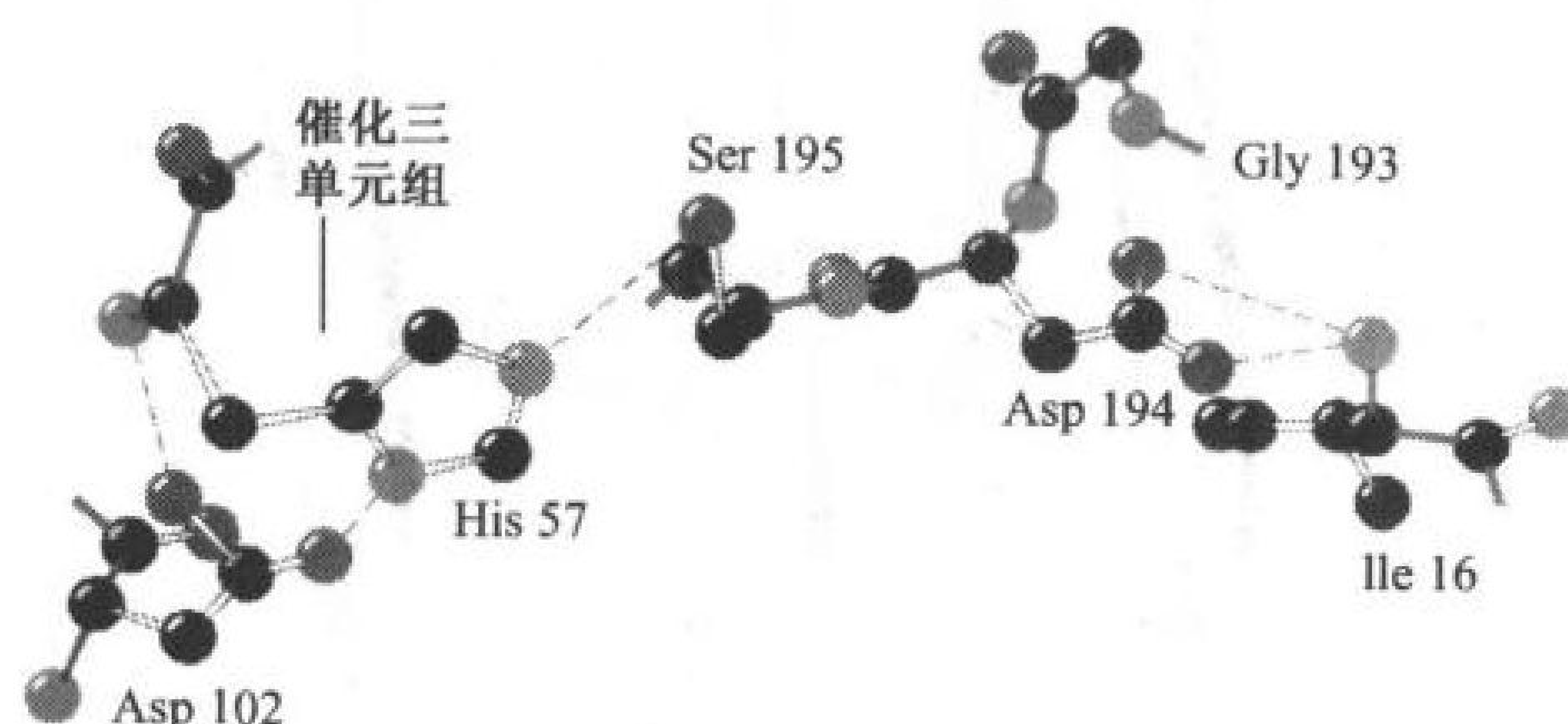


图 11-24　胰凝乳蛋白酶的活性中心

观察的方向类似于图 11-23 中的方向。催化三单元组由 Ser 195、His 57 和 Asp 102 构成。[引自 Blow, D. M. and Steitz T. A., Annu. Rev. Biochem., 39, 86(1970)]

尽管如此,直接位点突变(节 3-5D)导致胰蛋白酶的 Asp 189 变为 Ser 并没有使它的专一性变得与胰凝乳蛋白酶一样,而是生成了一个低劣、非特异的蛋白酶。用胰凝乳蛋白酶的残基替换胰蛋白酶专一性口袋中的附加残基也没有显著提高催化活性。然而,当与专一性口袋壁(残基 185～188 和 221～225)连接的两个表面环被胰凝乳蛋白酶的残基替换时,胰蛋白酶就转换为具有活性的类胰凝乳蛋白酶。这些环在每种酶中都是保守的,显然它对底物结合不是必需的,但是对于待断裂键合适定位是必需的。这些结果向基因工程师提出了一个重要警告:酶能如此精巧的裁剪以适应其功能,以至于它们经常以意想不到的方式产生突变修补。

丝氨酸蛋白酶间的进化关系

蛋白间的序列和结构相似性揭示了它们的进化关系(节 5-4 和节 6-2C)。胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶和弹性蛋白酶间高度相似性表明这些蛋白来自一种古老的丝氨酸蛋白酶基因拷贝,随后导致酶的分支进化。实际上,这些胰腺酶与某种病毒蛋白酶在结构上十分相似就指明原始胰蛋白酶基因出现在原核生物和真核生物的分化以前。

这里有两种已知丝氨酸蛋白酶，其一级和三级结构相互之间或与胰凝乳蛋白酶都没有明显的关系。尽管如此，在其活性中心这些蛋白仍含有与胰凝乳蛋白酶相似的催化三单元组。这些酶是：**枯草杆菌蛋白酶**(subtilisin)，一种从杆菌属中分化出来的内肽酶；小麦细菌**丝氨酸羧肽酶II**(serine carboxypeptidase II)，一种外肽酶。由于这三种丝氨酸蛋白酶相应活性中心残基的氨基酸序列是完全不同的(图 11-25)，则它们不太可能是由同一个古老蛋白进化而来。这些酶显然构成了**收敛进化**(convergent evolution)的一个明显的例子：自然界至少三次独立地发现了相同的催化机理。

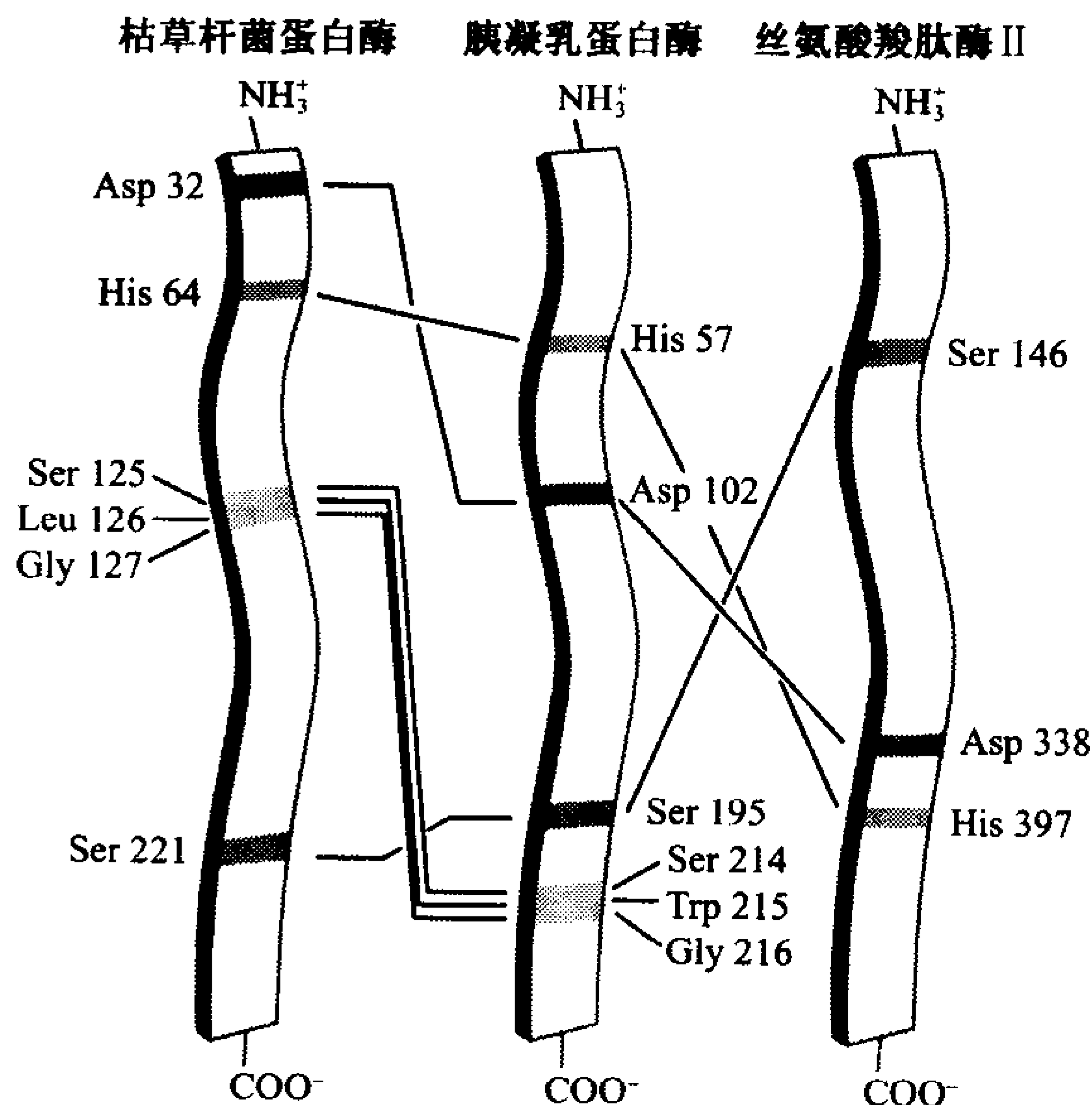


图 11-25 三个无关丝氨酸蛋白酶活性中心残基相对位置指示图例

枯草杆菌蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和丝氨酸羧肽酶 II 中的催化三单元组都含有 Ser、His 和 Asp 残基。胰凝乳蛋白酶中 Ser 214、Trp 215 和 Gly 216 多肽骨架以及它们在枯草杆菌蛋白酶中相应部分参与了底物结合相互作用。[引自 Robertus J. D., Alden, R. A., Birkteft, J. J., Kraut, J. C., 和 Wilcox, P. E., Biochemistry 11, 2449(1972)]

C. 催化机理

用已有的化学和结构数据为基础阐明了催化机理，在这里以胰凝乳蛋白酶为例加以说明(图 11-26)，它也能应用于所有的丝氨酸蛋白酶以及其他一些水解酶：

314

1) 在胰凝乳蛋白酶结合底物以后，Ser 195 亲核进攻待断裂肽键的羰基基团构成**四面体中间物**(tetrahedral intermediate)，它类似反应过渡态(共价催化)。X 射线研究表明 Ser 195 处于理想的位置以进行亲核进攻，当然，催化中同样存在近邻效应和定向效应。亲核进攻中涉及到质子迁移到 His 57 的咪唑环上，形成咪唑离子(imidazolium ion)(普通碱催化)。非溶剂化 Asp 102 羧化物离子极化作用促进这一过程的发生，Asp 102 与 His 57 以氢键结合(静电催化)。四面体中间物虽然是瞬时的，但确实存在。我们将看到大多数胰凝乳蛋白酶催化动力源自于它与过渡态的优先结合(过渡态结合催化)。

2) 四面体中间物在 His 57 的 N3 给出质子的推动下分解为**酰基酶中间体**(acyl-enzyme in-

termediate)(普通酸催化)。氨基离去基团($R'NH_2$,被切割多肽链新的 N 端部分)从酶上释放下来并被溶液中的水取代。酰基酶中间体非常容易被水解切割。尽管它非常不稳定,但在温度低至足以抑制催化时,通过 X 射线晶体学方法已观察到弹性蛋白酶的酰基酶中间体。

3)和 4) 酰基酶中间体脱酰基过程几乎是前一步的逆向过程,随后释放生成的羧化产物(被

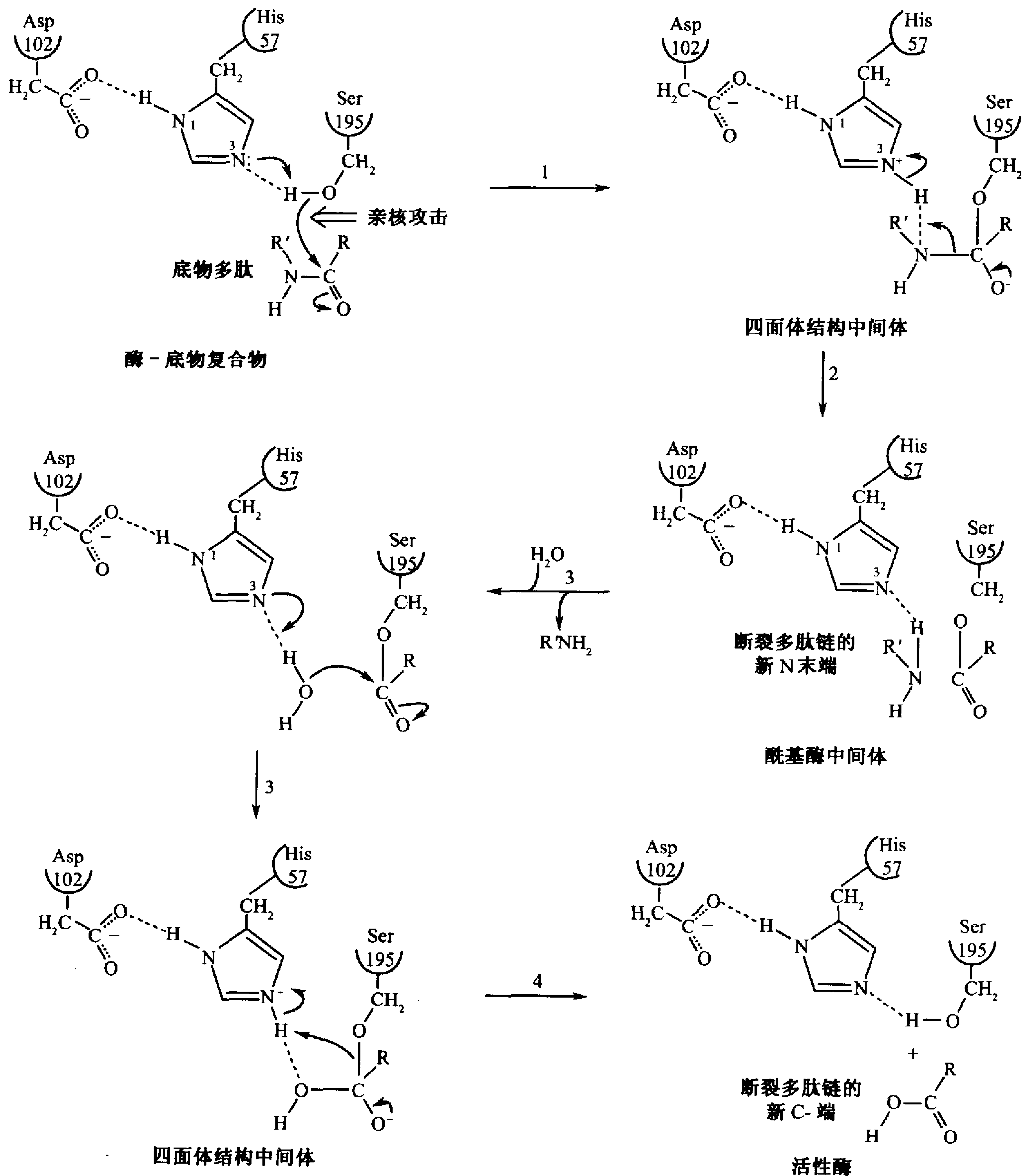


图 11-26 功能的秘诀:丝氨酸蛋白酶的催化机理

反应包含(1)活性位点 Ser 对断裂肽键上的羰基碳原子的亲核进攻形成正四面中间体。(2)四面体结构的中间体通过普通的酸催化在活性位点 Asp 极化 His 裂解为酰基酶中间体,紧接着胺产物的丢失和由水分子替代它的位置。(3)第二步的逆反应以形成第二个四面体中间体;(4)第一步的逆反应以产生反应的羧基产物和活性酶。

切割多肽链新的 C 端部分),由此重新生成活性酶。在该过程中,水是亲核进攻试剂,Ser 195 是离去基团。

丝氨酸蛋白酶优先结合过渡态

由几种丝氨酸蛋白酶-抑制剂复合物的 X 射线衍射结构的详细比较,揭示了这些酶催化的进一步的结构基础(图 11-27):

1) 随着四面体中间体形成产生的构象变形,导致待断裂肽的阴离子羰基氧深深进入活性中心,并占据先前闲置的被称之为氧负离子洞穴的位置。

2) 它形成两个氢键,这在羰基处于正常三角构象时是不能形成的。这两个酶氢键供体是由 Joseph Kraut 首先发现的,它们占据胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶中的相应位置。他以收敛进化使得这些不相干酶的活性中心在功能上是同一的为前提基础,提出了氧负离

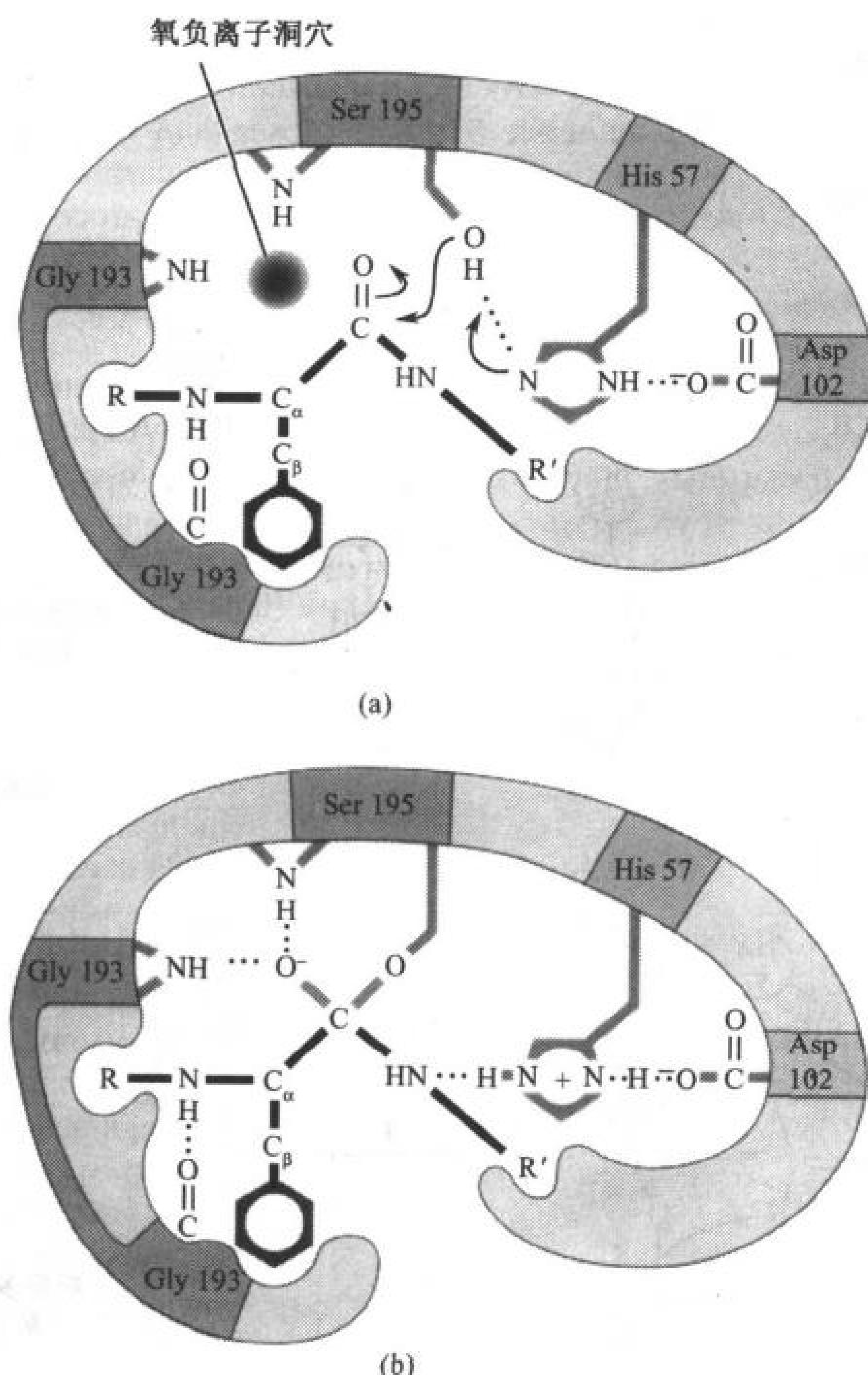


图 11-27 丝氨酸蛋白酶中稳定的过渡态

(a)当底物结合到酶上时,待断裂肽键的三角形羰基碳因与氧负离子洞穴结合而受到构象限制(上)。(b)在四面体中间体中,待断裂肽键带电羰基氧(氧负离子)进入氧负离子空洞中并与 Gly 193 和 Ser 195 的骨架 NH 基团形成氢键。随后由构象变形使得残基的 NH 基团在待断裂肽键前与 Gly 193 形成另一个不饱和的氢键,因此丝氨酸蛋白酶优先与四面体中间体结合。[引自 Robertus J. D., Kraut, J., Alden, R. A., and Birktoft, J. J., Biochemistry 11, 4302(1972)]

子空洞存在的假设。

3）更进一步，四面体的变形允许在待断裂肽键前，在酶和残基的骨架 NH 基团间形成另一个不饱和的氢键。

*在酶-底物或酰基酶中间体上面，过渡态（或四面体中间体）的优先结合主要来自于丝氨酸蛋白酶极大的催化效率。*因此，在胰凝乳蛋白酶催化三单元组中任何或全部残基变异后，酶仍能比非催化反应提高约 5×10^4 倍（天然酶能提高约 10^{10}倍）。与此相似，DIPF 作为一种有效的丝氨酸蛋白酶抑制剂也是因为它的四面体磷酸酯基团使其能成为过渡态类似物。

315

四面体中间体类似于胰蛋白酶与它的抑制剂复合物

Robert Huber 在**牛胰蛋白酶抑制剂**（bovine pancreatic trypsin inhibitor, BPTI）和胰蛋白酶复合物的 X 射线衍射研究中得到了四面体中间体存在的最有说服力的结构证据。58 残基的 BPTI 结合到胰蛋白酶的活性中心以形成一个紧紧包裹的内表面和具有氢键交叉网络的化合物。此相互作用防止了任何胰蛋白酶在胰脏中过早被激活而将胰脏消化掉（节 11-5D）。该化合物的缔合常数为 $10^{13}(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}$，是已知蛋白-蛋白相互作用中最大的，这也就说明了 BPTI 的生理上的重要性。

BPTI 与胰蛋白酶活性中心接触的部分类似于结合的底物。BPTI 一个专一的 Lys 侧链占据胰蛋白酶的专一性口袋（图 11-28a），抑制剂的 Lys-Ala 肽键所处的位置好像就是待断裂的肽键（图 11-28b）。BPTI-胰蛋白酶复合物中最显著的是它的构象正好处于反应路径中生成四面体中间体的方向：胰蛋白酶 Ser 195——活性 Ser 的侧链氧与 BPTI 的“待断裂”肽键中锥体变形的羰基碳的接触小于范德华距离（2.6Å）。然而，由于该化合物的刚性，蛋白水解反应并不能跳越这一步，而且它如此紧密的密闭不能使离去基团脱掉，水也不能进入反应区。

316

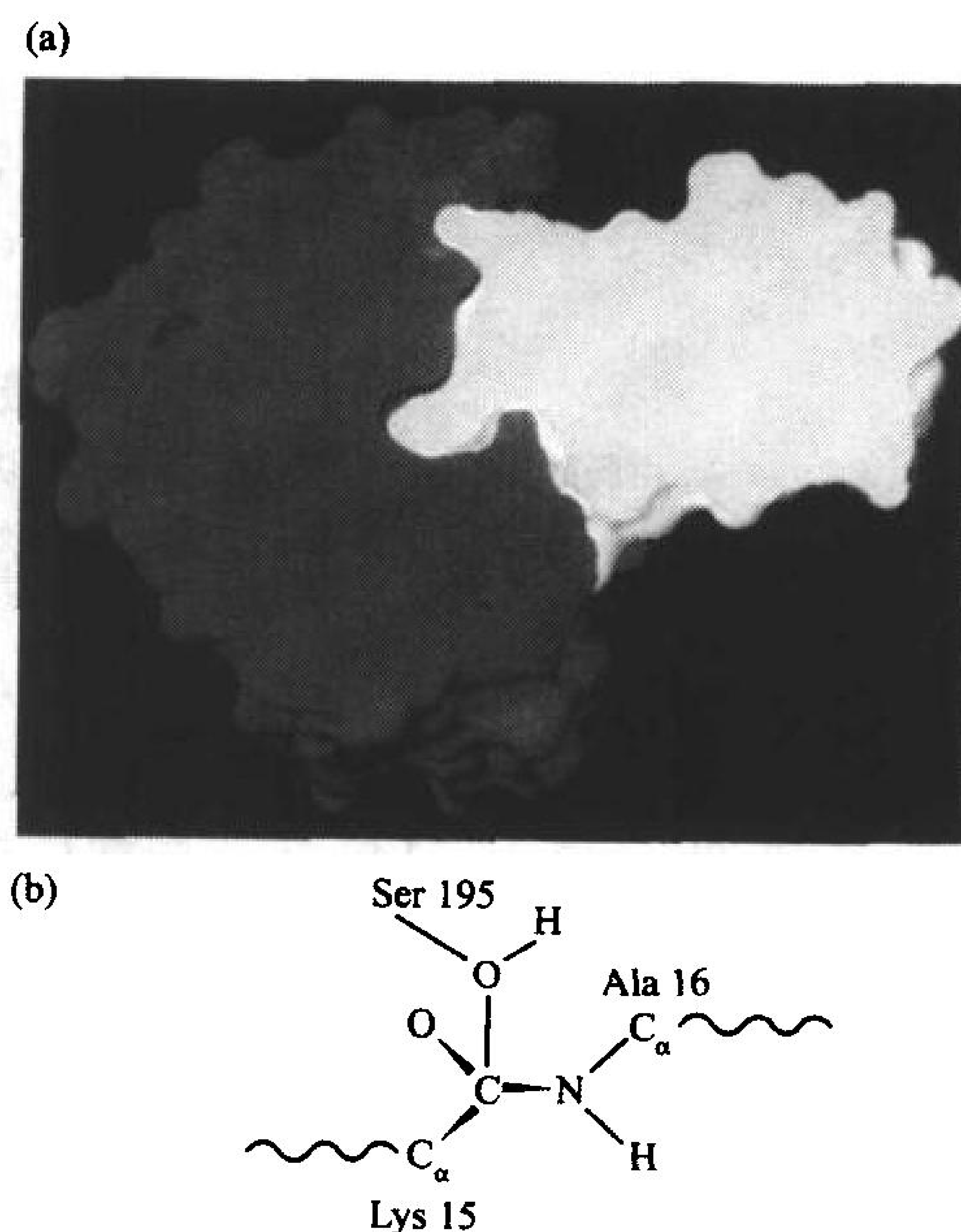


图 11-28　胰蛋白酶- BPTI 复合物

(a) 用计算机生成的剖面图表示的 X 射线衍射结构图，它显示了胰蛋白酶（红色）是如何与 BPTI（绿色）结合的。在图的中部，绿色突出延伸插入红色空穴代表抑制剂的 Lys 15 残基占据胰蛋白酶的专一性口袋，注意两个蛋白的紧密互补。（图得到纽约大学的 Michael Connolly 的允许）(b) 胰蛋白酶 Ser195 与 BPTI 的待断裂肽键的羰基碳以小于范德华距离接触，形成锥体变形面向 Ser195。普通蛋白水解反应在形成四面体中间体前在反应路径上的某处就被中断了。

蛋白酶抑制剂在自然中是很普遍的，它们起保护和调节的功能。例如，某种植物为对付昆虫的咬噬而释放出蛋白酶抑制剂，因此导致进犯的昆虫因消化酶的失活而被饿死。蛋白酶抑制剂约占血浆蛋白的 10%，例如，由肝脏分泌的 **α_1-蛋白酶抑制因子**（α_1-proteinase inhibitor）抑制**白血球弹性蛋白酶**（Leukocyte elastase），白血球是一种白血细胞；白血球弹性蛋白酶的作用被认为是炎症过程的一部分。α_1-蛋白酶抑制因子活性减小的病理性变异与**肺气肿**（pulmonary emphysema）有关，肺气肿是肺的弹性纤维水解导致的变性疾病。吸烟者也因 α_1-蛋白酶抑制因子的活性降低而受到伤害，这是因为吸烟氧化其活性中心 Met 残基的缘故。

D. 酶原

蛋白水解酶通常生物合成称为**酶原**(zymogen)的较大非活性前体(酶的前体通常被称为proenzyme)。在消化酶的情况中,其原因是非常清楚的:这些酶如果被合成为活性形式,它们将消化合成它们的组织。实际上,**急性胰腺炎**(acute pancreatitis),是一种非常疼痛、可以造成致命的疾病,是由胰腺的创伤造成的,其特征就是由该器官合成的消化酶的提前激活。

胰蛋白酶原(trypsinogen)的激活发生在胰蛋白酶原从胰脏进入十二指肠时,**肠肽酶**(enteropeptidase),一种由肠黏膜分泌的受荷尔蒙控制的丝氨酸蛋白酶,通过特异性切断胰蛋白酶原Lys 15-Ile 16 间的肽键,切除其N-端的六肽(图 11-29)。由于该活性切割发生在胰蛋白酶敏感位点(回忆一下,胰蛋白酶切割 Arg 和 Lys 残基后的肽键),由肠肽酶产生的少数胰蛋白酶也能催化胰蛋白酶原的激活,产生更多的胰蛋白酶等。因此,胰蛋白酶原的激活可以说是**自催化**(autocatalytic)。

317

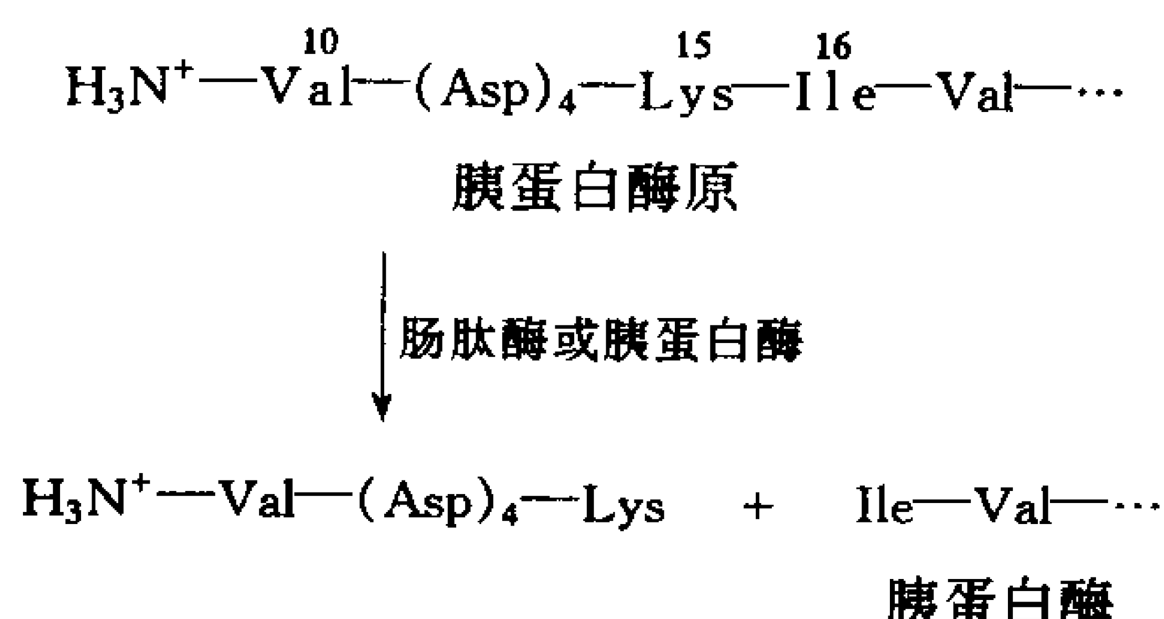


图 11-29 胰蛋白酶原到胰蛋白酶的激活过程

由肠肽酶或胰蛋白酶催化蛋白水解切除 N 端六肽。这里使用胰凝乳蛋白酶原的编号系统;也就是,Val 10 实际上是胰蛋白酶原的 N 端,Ile16 是胰蛋白酶的 N 端。

胰凝乳蛋白酶原由胰蛋白酶催化的 Arg15-Ile16 肽键切割所激活,形成 π-胰凝乳蛋白酶(图 11-30)。π-胰凝乳蛋白酶随后经过**自溶**(autolysis,自身消化),特异性切割掉 2 个二肽,Ser 14-Arg 15 和 Thr 147-Asn 148,产生同样具有活性的酶—α-胰凝乳蛋白酶(通常简称为胰凝乳蛋白酶)。后一过程的生物意义现在还不清楚。

弹性蛋白酶原(proelastase),弹性胰蛋白酶的酶原,由简单胰蛋白酶切割短 N 端肽而被激活。胰蛋白酶同样激活**胰羧肽酶原 A**(procarboxypeptidase A)和**胰羧肽酶原 B** 和**磷脂酶原 A_2**(prophospholipase A_2)(节 9-1C)。胰蛋白酶原激活过程的自催化性质和胰蛋白酶激活其他水解酶的事实,使得胰蛋白酶原在胰腺里不能被激活是必要的。我们已经看到诸如 BPTI 的胰蛋白酶抑制剂几乎不可逆的结合就防止了胰蛋白酶原不适当的激活。另外两个保护机制是:

1) 由胰蛋白酶催化的胰蛋白酶原激活过程是非常慢的,推测可能因为其高度保守的 N 端六肽非常高的负电荷(图 11-29)排斥胰蛋白酶特异性口袋背后的 Asp 残基的缘故。
2) 胰腺酶原通常储存在被称之为**酶原粒**(zymogen granule)的细胞内囊中,其壁膜可以阻止蛋白降解。

连续的酶原激活使得在对不同生理信号反应时产生大量的激活酶成为可能。例如,引起血液凝固的丝氨酸蛋白酶由肝脏合成酶原,并在血液中循环,直到血管受到伤害时被激活为止(见框 11-5)。

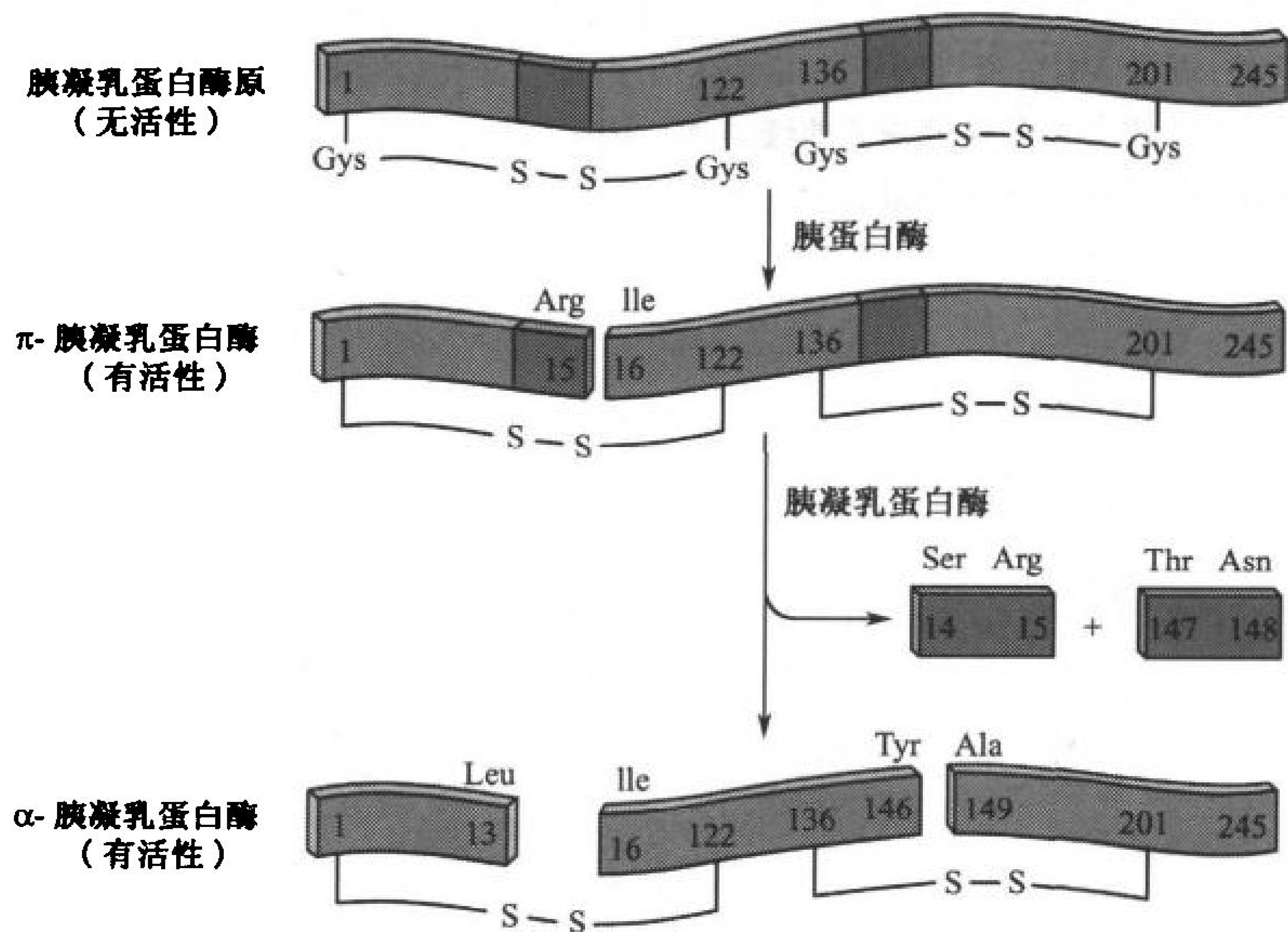


图 11-30 通过蛋白水解切割的胰凝乳蛋白酶激活过程

π 和 α 胰凝乳蛋白酶都具有酶催化活性。

框 11-5 健康和疾病的生物化学

血液凝结级联机制

当血管受到伤害时，血凝块是血小板（无细胞核的小血液细胞）聚集的结果，不溶性**血纤蛋白**（fibrin）网的形成俘获更多的血液细胞。血纤蛋白是可溶性流动蛋白——血纤蛋白原（fibrinogen）在丝氨酸蛋白酶——**凝血酶**（thrombin）的作用下生成的，凝血酶是一系列从其酶原形式被蛋白水解而顺序激活的凝固蛋白酶的最后一个，整个过程被称之为**血液凝结级联机制**（coagulation cascade），虽然实验证据表明它并非像提出的瀑布模拟那样完全严格成线形关系。

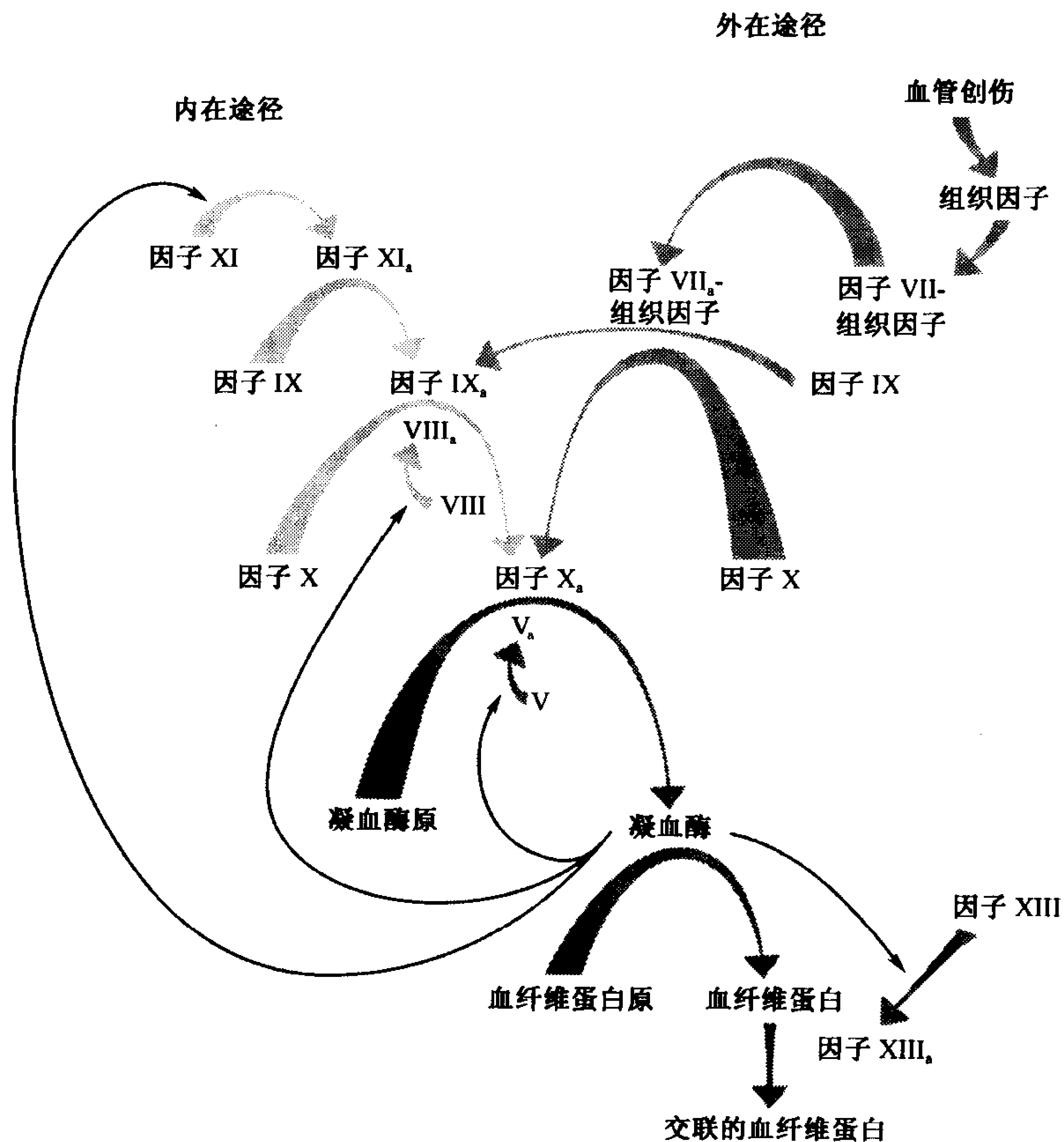
血液凝结级联机制中不同部分，包括酶和一些非酶蛋白辅因子，用罗马数字标明。由于一些历史的原因，这些数字不能完全反映它们在生命体中的顺序，后缀 a 表示活性因子。

凝结蛋白酶的催化区域在序列和机理上类似胰蛋白酶，但对底物的专一性更高。附加区域调节与辅因子间的相互作用并协助将蛋白锚定在血小板的膜上，血小板的膜就像一个许多凝结反应发生的舞台。

当由组织释放一个蛋白［**组织因子**（tissue factor）］与流动因子 VII 或 VIIa（因子 VIIa 通过痕量的包括因子VIIa本身在内的其他凝结蛋白酶的作用由因子 VII 生成）形成复合物时，凝结就开始了。组织因子-VIIa 复合物通过蛋白水解将酶原因子 X 转变为因子 Xa，因子 Xa 随后将**凝血酶原**（prothrombin）转变为凝血酶，随后生成血纤维蛋白。依赖组织因子的凝结步骤被称之为**外在路径**（extrinsic pathway），因为组织因子的来源是血管外的。一旦因子 Xa 被生成，通过一种抑制因子 VII 的蛋白使得外在路径很快减弱。

持续的凝血酶作用需要**内在途径**（intrinsic pathway），用此命名是因为它的所有组分都存在于循环系统中。内在途径由组织因子-VIIa 复合物将因子 IX 转变为其活性形式 IXa 而被激活。随之产生的凝血酶激活内在途径的大量组分，包括因子 XI（激活因子 IX 的蛋白酶），以在缺乏组织因子或因子 VIIa

时仍保持凝结。凝血酶同样激活因子 V 和 VIII，它们是辅因子而不是蛋白酶。因子 Va 通过因子 Xa 提高凝血酶的活性，因子 VIIIa 通过因子 IXa 提高因子 X 的活性。这样，凝血酶通过一个反馈机制提高了自身的活性，从而放大了级联过程的前续步骤。因子 XIII，它是一种化学交联血纤维蛋白形成一个强的纤维网络的酶，也是由凝血酶激活的。



凝结的内在途径能被诸如玻璃的负电荷表面所触发，当血液被收集到干净玻璃试管中时会发生凝结。在缺乏组织因子时，血纤维蛋白可能几分钟都不会出现，但当存在组织因子时，在几秒内就会出现凝固，这表明生物体内快速的血液凝固需要组织因子和内在途径的蛋白。对外在途径重要性的一个额外的证明是因子 VII 不足的人会血流不止。先天缺乏因子 VIII[**血友病 a**(hemophiLia a)和因子 IX(血友病 b)同样可导致异常的流血。有趣的是，因子 XI 的不足仅仅导致轻度的流血紊乱。

由于痕量因子 VIIa、IXa 和 Xa 能激活它们大量的各自底物，因此在凝结级联机制中酶原的依次激活就引起凝血酶活性的级联增长。并不奇怪，凝血酶最终激活结束凝块形成的机制，从而限制凝结过程的持续时间和范围。这样的凝结控制具有非常重要的生理意义，因为即使人体内任何一个不合适的血液凝块都会导致致命的后果。[图来自于 Davie, E. W., Thromb, Haemost. 74.2(1995)]

318

酶原具有变形的活性中心

既然胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶的酶原都具有完整的催化残基，为什么它们不能具有酶的功能？将胰蛋白酶与其酶原、胰凝乳蛋白酶与其酶原的 X 射线衍射结构进行比较，显示在激活过程中新释放出的 N 端 Ile16 残基从蛋白的表面移至内部，在那里其自由阳离子氨基基团与不变的阴离子 Asp194(与催化三单元组接近)形成离子对(图 11-24)。没有这样的构象变

化，就不能正确地形成它的特异性口袋和氧负离子空洞，因此酶不能与其底物合适的结合或不能稳定四面体中间体。这提供了更多有利于证明在丝氨酸蛋白酶催化机理中过渡态结合的角色重要性的结构证据。然而，因为它们的催化三单元组是完整的，丝氨酸蛋白酶原实际上有很低的催化活性，在进行了上述结构比较以后所作的观察也证实了可能是这样的情形。

小 结

1. 酶，几乎全是蛋白质，被分为 6 大类。
2. 酶提高反应速度至少 10^{15}倍。
3. 酶对底物的专一性取决于它活性中心的几何和电子特征。
4. 一些酶催化反应需要金属离子辅因子或有机辅酶作为可逆结合的辅底物或永久性缔合辅助基团，许多辅酶来自于维生素。
5. 酶通过降低反应自由能($\Delta G^{\ddagger}$)来催化反应，该自由能是指达到反应中能量最高的过渡态所需要的能量。
6. 酶与化学催化有同样的催化机理，包括普通酸催化和普通碱催化，共价催化和金属离子催化。
7. 酶活性位点的功能基团的排列允许静电效应催化、邻近效应和定向效应催化。
8. 酶介导催化中特别重要的机理是其与所催化反应的过渡态的优先结合。
9. 溶菌酶的催化机理包括 Glu 35，它的不带电的形式，作为一个酸催化剂以断裂多糖底物的 D 和 F 环之间的键，导致带正电荷平面水合氢离子与 Asp 52 的羧酸盐形式的静电稳定化，通过残基 D 变为与反应过渡态类似的半椅式构象促进此反应发生。
10. 丝氨酸蛋白酶在结合口袋附近含有 Ser-His-Asp 催化三联体，它们对酶的底物专一性的决定大有帮助。
11. 丝氨酸蛋白酶通过酸-碱催化、共价催化、邻近效应和定向效应、静电催化、以及过渡态与氧负离子的优先结合实现了催化。
12. 胰腺蛋白酶以酶原的形式合成，这保护了胰腺不被自身消化。通过专一的蛋白切割而使酶原激活。

参 考 文 献

催化机制

Fersht, A., *Enzyme Structure and Mechanism* (2nd ed.), Freeman (1985).

Gerlt, J.A., Protein engineering to study enzyme catalytic mechanisms, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 593–600 (1994). [Describes how information can be gained from mutagenesis and structural analysis of enzymes.]

Hackney, D.D., Binding energy and catalysis, *in* Sigman, D.S. and Boyer, P.D. (Eds.), *The Enzymes* (3rd ed.), Vol. 19, pp. 1–36, Academic Press (1990).

Kraut, J., How do enzymes work? *Science* **242**, 533–540 (1988). [A brief and very readable review of transition state theory and applications.]

Kyte, J., *Mechanism in Protein Chemistry*, Garland Publishing (1995).

Schramm, V.L., Horenstein, B.A., and Kline, P.C., Transition state analysis and inhibitor design for enzymatic reactions, *J. Biol. Chem.* **269**, 18259–18262 (1994).

溶菌酶

Johnson, L.N., Cheetham, J., McLaughlin, P.J., Acharya, K.R., Barford, D., and Phillips, D.C., Protein–oligosaccharide interactions: Lysozyme, phosphorylase, amylases, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **139**, 81–134 (1988).

Kirby, A.J., Mechanism and stereoelectronic effects in the lysozyme reaction, *CRC Crit. Rev. Biochem.* **22**, 283–315 (1987).

Strynadka, N.C.J. and James, M.N.G., Lysozyme revisited: crystallographic evidence for distortion of an *N*-acetylmuramic acid residue bound in site D, *J. Mol. Biol.* **220**, 401–424 (1991).

丝氨酸蛋白酶

Craik, C.S., Roczniak, S., Largman, C., and Rutter, W.J., The catalytic role of the active site aspartic acid in serine proteases, *Science* **237**, 909–913 (1987).

Davie, E.W., Biochemical and molecular aspects of the coagulation cascade, *Thromb. Haemost.* **74**, 1–6 (1995). [A brief review by one of the pioneers of the cascade hypothesis.]

Hedstrom, L., Szilagyi, L., and Rutter, W.J., Converting trypsin to chymotrypsin: the role of surface loops, *Science* **255**, 1249–1253 (1992).

Perona, J.J. and Craik, C.S., Evolutionary divergence of substrate specificity within the chymotrypsin-like serine protease fold, *J. Biol. Chem.* **272**, 29987–29990 (1997).

Phillips, M.A. and Fletterick, R.J., Proteases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 713–720 (1992). [A review of the mechanisms and physiological importance of different types of proteases.]

关　键　词

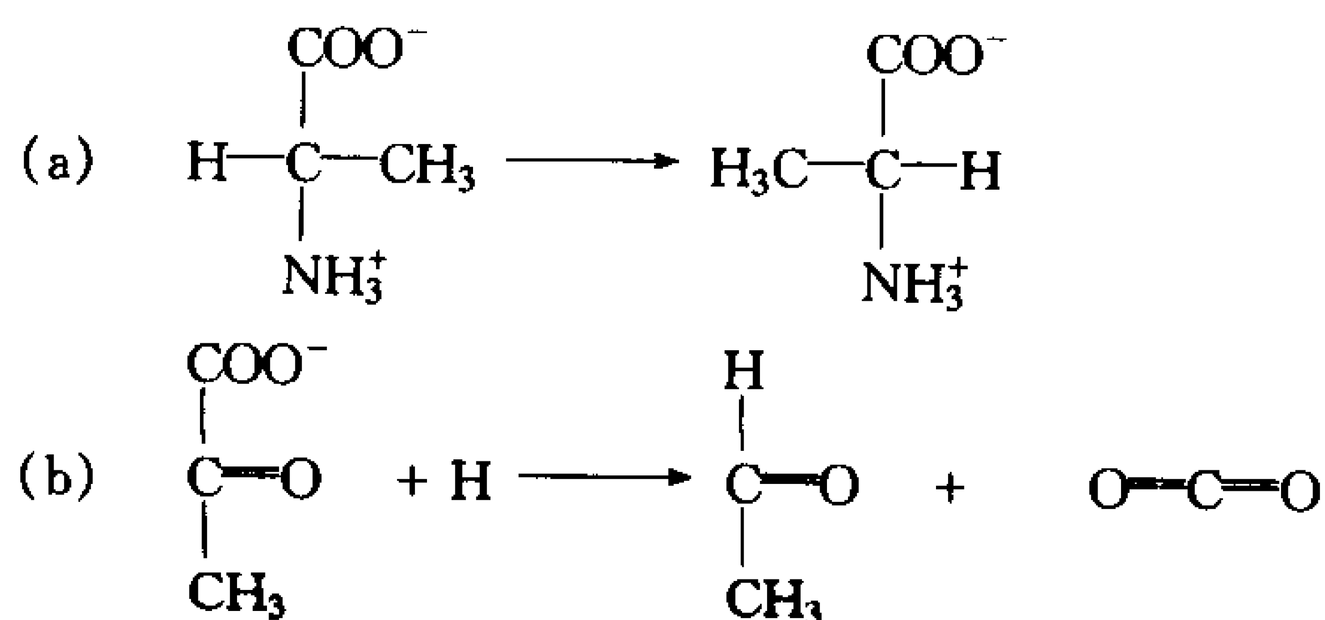
活性中心	active site	辅基	prosthetic group
普通碱催化	general base catalysis	亲和标记	affinity labeling
底物	substrate	全酶	holoenzyme
共价催化	covalent catalysis	催化三单元	catalytic triad
酶委员会分类	EC classification	脱辅基酶	apoenzyme
金属酶	metalloenzyme	收敛进化	convergent evolution
诱导楔合	induced fit	维生素	vitamin
金属活化酶	metal-activated enzyme	四面体中间物	tetrahedral intermediate
原手性	prochirality	过渡态	transition state
静电催化	electrostatic catalysis	酰基-酶中间物	acyl-enzyme intermediate
辅因子	cofactor	自由能	$\Delta G^{\ddagger}$
过渡态类似物	transition state analog	负氧离子空洞	oxyanion hole
辅酶	coenzyme	限速步骤	rate-determining step
氧鎓离子	oxonium ion	酶原	zymogen
共底物	cosubstrate	普通酸催化	general acid catalysis
丝氨酸蛋白酶	serine protease		

学习思考题

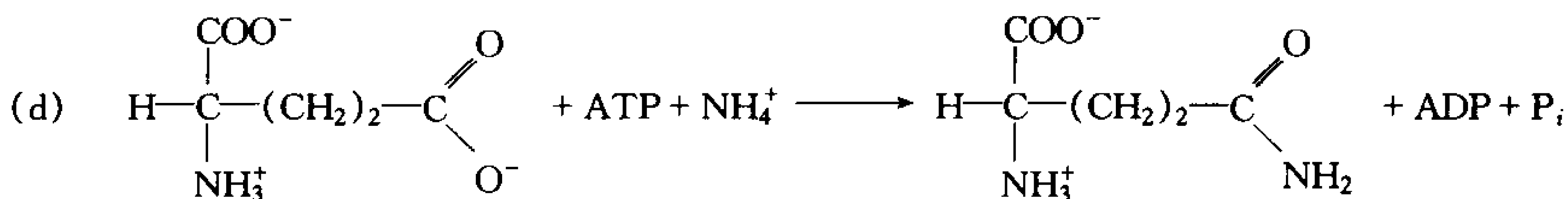
1. 酶与其他催化剂的区别是什么？
2. 影响酶底物专一性的因素是什么？
3. 为什么一些酶反应需要辅因子？
4. 描述并标识一个反应在有催化剂和没有催化剂的情况下过渡态图的变化部分。
5. ΔG 和 $\Delta G^{\ddagger}$ 之间的联系。
6. 解释亲核试剂是如何进行共价催化的。
7. 为什么非酶催化剂不可能通过过渡态稳定过程发挥作用？
8. 描述溶菌酶反应的机理。
9. 丝氨酸蛋白酶中氧负离子空洞的功能是什么？
10. 描述在胰腺中防止酶原不适当激活的机理。

练　习　题

1. 依次指出催化如下反应的酶的类型(表 11-2)。



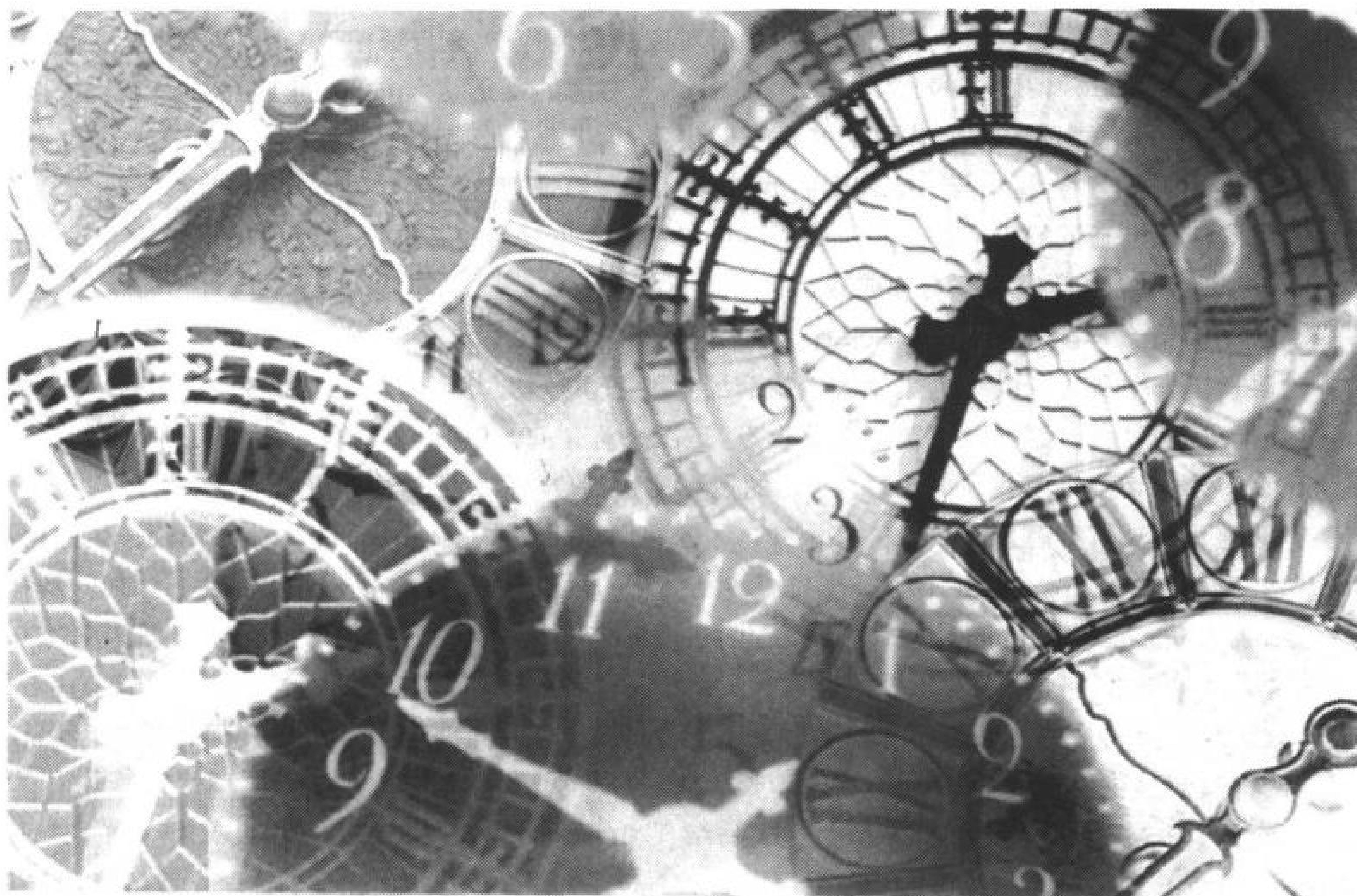
(c) $CH_3-CO-COO^- + NADH + H^+ \longrightarrow CH_3-CH(OH)-COO^- + NAD^+$

(d) 

2. 绘出如下情况的过渡态简图:(a)非酶催化反应;(b)对应酶促反应中,S 与酶松弛结合;(c)对应酶促反应中,S 与酶紧密结合。比较每种情况中的 $\Delta G^{\ddagger}$ 变化。为什么 S 与酶的紧密结合并不是有利的?
3. 不同 pH 条件下的研究表明一种酶有两个重要的催化残基,其 pK 分别约为 4 和 10,化学修饰实验表明 Glu 和 Lys 残基是活性必需的,指出与 pK 匹配的残基并解释它们是否可能为酸碱催化剂。
4. 某种酶的共价催化机制依赖于 pK 为 8 的单个活性 Cys。邻近一个残基的突变使得微环境发生改变,pK 增加到 10。该突变将导致反应速率增加或减少?并加以解释。
5. 请解释 RNase 为什么不能催化 DNA 的水解。
6. 构想一种区别于书中所讨论类型的脯氨酸消旋酶的过渡态模拟物,并证明其合理性。
7. Wolfenden 指出区别酶的"结合位点"和"催化位点"是没有意义的,试加以解释。
8. 解释为什么溶菌酶切割人工模拟底物$(NAG)_4$ 的速度比切割$(NAG)_6$ 慢约 4000 倍。
9. 溶菌酶有效催化需要其残基 Asp 101 和 Arg 114,尽管它们与活性中心 Glu 35 和 Asp 52 相距一定的距离。用 Ala 取代 Asp 101 或者 Arg 114 并不明显改变酶的三级结构,但却明显降低酶的催化活性。试加以解释。[此问题由 Bruce Wightman, Muhlenberg College 提供]
10. 设计一种弹性蛋白酶的抑制剂氯甲基酮。
11. 假设胰凝乳蛋白酶和枯草杆菌蛋白酶的相似具有催化重要性,对其催化活性中心几何性质加以比较,使我们对这两种酶的催化机理有了很好的理解。试对这种做法的正确性加以讨论。
12. 预测胰蛋白酶中 Asp102 变异为 Asn 后对(a)底物结合和(b)催化的影响。
13. 豆腐(大豆凝乳),一种高蛋白大豆制品,是用某种方法去除大豆中的胰蛋白酶抑制剂,请解释这样做的原因。
14. 解释为什么胰凝乳蛋白酶不像胰蛋白酶一样可以自激活。

(清华大学　周玉祥　译　郑昌学　校)

第 12 章　酶动力学、抑制与调节



酶的速度和效率可被量化，有助于认识其机制和生理作用。(引自 Reza Estakhvian/Tony Stone Images/New York, Inc.)

早期酶学家常利用酵母或肝细胞的粗制品进行酶的研究，他们只能观察底物在未经纯化的酶催化下向产物的转化。这种情况下，反应速率的测量就成了鉴定酶活性的有力工具。将简单的数学模型应用于不同实验条件下的酶活性，以及存在竞争性底物或酶抑制剂条件下的酶活性，可以推断各种酶可能的生理功能和作用机制。

酶反应速率的研究，或称**酶动力学**(enzyme kinetics)，其重要性与 20 世纪早期相比一点也没减小。很多情况下，反应速率及其随不同反应条件的变化揭示了反应物的转化途径，因而能说明反应的机制。动力学数据，结合有关酶的结构和催化机制的详细信息，提供了酶生物功能的某些最有价值的线索，并可提供以治疗为目的的酶修饰途径。

我们首先回顾化学动力学来开始关于酶动力学的探讨，然后导出酶动力学的基本方程，并描述抑制剂对酶的作用。我们还将讨论突显酶功能多方面的一个酶调节的例子。

1. 反应动力学

酶催化反应的动力学测量，是阐明酶催化机制的最有力的手段之一，酶动力学是化学动力学的一个分支，所以我们通过回顾化学动力学的概念作为本节的开始。

A. 化学动力学

具有总化学计量关系的反应：



$$A \rightarrow P$$

其中 A 代表反应物，P 代表产物，它实际上可以通过一系列**基本反应**(elementary reaction)(简单分子过程)而发生，如：



$$A \rightarrow I_1 \rightarrow I_2 \rightarrow P$$

这里 I_1 和 I_2 表示反应**中间物**(intermediate)。每个基本反应的特性构成了对总反应过程的机理描述。

反应级数

常温下，基本反应的速率与反应分子的碰撞频率成正比，比例常数称为**速率常数**(rate constant)，以符号 k 表示。对于基本反应 A→P，产物出现或反应物消失的瞬时速率称为**反应速度**(velocity, v)，为：

$$v = \frac{d[P]}{dt} = -\frac{d[A]}{dt} = k[A] \qquad [12\text{-}1]$$

即，任何时间的反应速度与反应物 A 的浓度成正比，这是**一级**(first-order)反应的一个例子。由此，速率常数的单位是秒的倒数(s^{-1})。一个基本反应的**反应级数**(reaction order)与反应**分子数**(molecularity)相关，反应分子数是指必须同时碰撞以生成产物的分子个数。所以，一级基本反应是**单分子**(unimolecular)反应。

324

考虑反应 2A→P，此**双分子**(bimolecular)反应是一个**二级**(second-order)反应，其瞬时速度用下式表示：

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = k[A]^2 \qquad [12\text{-}2]$$

这种情况下，反应速度与 A 浓度的平方成正比，二级速率常数 k 的单位是 $M^{-1} \cdot s^{-1}$。

双分子反应 A+B→P 也是一个二级反应，其瞬时速度由下式表示：

$$v = -\frac{d[A]}{dt} = -\frac{d[B]}{dt} = k[A][B] \qquad [12\text{-}3]$$

这里，反应可被看成分别是[A]和[B]的一级反应。单分子和双分子反应很普遍，而**三分子**(termolecular)反应不多见，因为三个分子同时碰撞是罕见事件，尚未发现四级或更高级反应。

速率方程

速率方程(rate equation)将反应进程描述为时间函数，可由描述瞬时反应速度的方程推导出

来。这样，由方程 12-1 重排即可获得一级速率方程：

$$\frac{d[A]}{[A]} = d\ln[A] = -kdt \qquad [12\text{-}4]$$

从 A 的初始浓度$[A]_0$至 t 时刻的浓度[A]积分：

$$\int_{[A]_0}^{[A]} d\ \ln[A] = -k\int_0^t dt \qquad [12\text{-}5]$$

结果得到：

$$\ln[A] = \ln[A]_0 - kt \qquad [12\text{-}6]$$

或对两边取反对数，得

$$[A] = [A]_0 e^{-kt} \qquad [12\text{-}7]$$

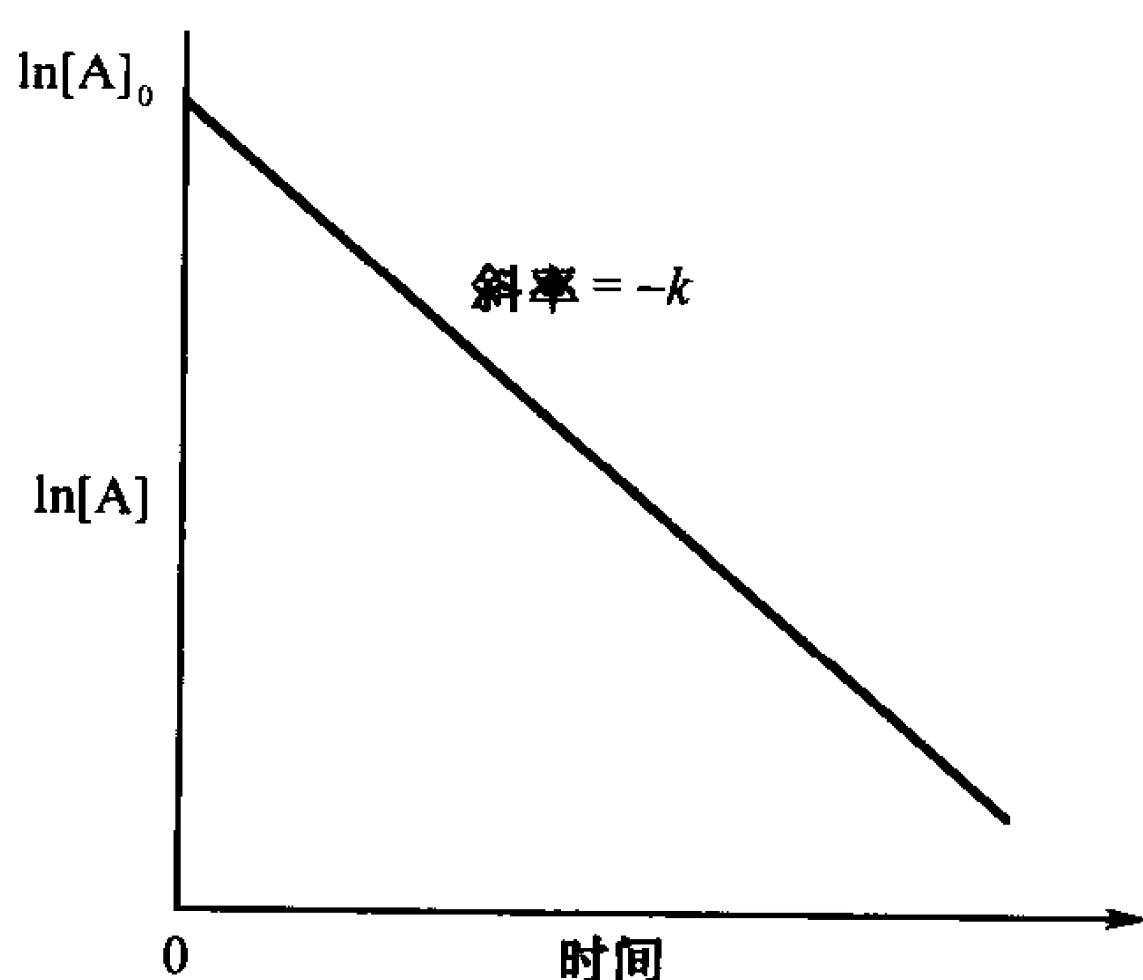


图 12-1 一级反应速率方程作图

以 ln[A]对时间作图，所得直线的斜率给出速率常数 k。

方程 12-6 是一个 $y = mx + b$ 形式的线性方程，可如图 12-1 所示画出。所以若反应为一级反应，则 ln[A]对 t 作图将产生一条斜率为 $-k$（一级速率常数的负数）、在 ln[A]轴上截矩为 $\ln[A]_0$ 的直线。

一级反应的特点之一就是其**半衰期**（half-life, or half-time）$t_{1/2}$，*即初始存在的反应物有一半分解的时间，为常数，与反应物的初始浓度无关*。这一点很容易阐明，将 $t = t_{1/2}$时的关系式$[A] = [A]_0/2$代入方程 12-6 得：

$$\ln\left(\frac{[A]_0/2}{[A]_0}\right) = -kt_{1/2} \qquad [12\text{-}8]$$

因而

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k} = \frac{0.693}{k} \qquad [12\text{-}9]$$

325

本身不稳定的物质，如放射性核，通过一级反应分解（见框 12-1）。

框 12-1 生物化学焦点

同位素标记

在实验室中对大分子或小分子进行标记常常是很有用的，因为这样可使它们在层析或电泳分离后，或在各种结合测定中很容易被检测。最常用的标记技术之一是将放射性同位素接到分子上，或用合成手段使放射性同位素代替正常出现的同位素。用这种方法标记的分子可在溶液中或固态下通过测量发射标记的放射性来检测。这种方法比光谱学测量更灵敏，而且常常比基于化学或生物活性的复杂测定更容易操作。用 NMR 活性同位素，如^{13}C，标记的代谢物也可用 NMR 技术在活组织中检测。

下表列出了在生物化学中一些最常用的放射性同位素[**放射性核**（radionuchide）]以及它们的半衰期和原子核自发裂变辐射的放射性类型。

末端核苷酸接上一个^{32}P，代替正常非放射性^{31}P，就可容易地标记核酸。蛋白质可通过化学或酶学方法，将^{125}I连接到 Tyr 残基上进行标记。细胞生长和分裂的检测常常是测量^{3}H标记的胸（腺嘧啶脱氧核）苷摄取量（胸苷全部掺入 DNA）。同样，蛋白质的合成可由蛋白质中的^{35}S标记的 Met 含量来监测。当然，特定同位素标记的选择也取决于实验的时间过程和放射性的探测方法。

放射性核	半衰期	放射类型[a]
^{3}H	12 年	β
^{14}C	5715 年	β
^{24}Na	15 小时	β
^{32}P	14 天	β
^{35}S	87 天	β
^{40}K	1.25×10^{9} 天	β
^{45}Ca	163 天	β
^{125}I	60 天	γ
^{131}I	8 天	β, γ

[a] β 粒子是发射的电子，γ 射线是发射的光子。

Geiger 计数器(Geiger counter)是用电子学方法探测气体因辐射穿过引起的电离，但它对低能量发射源如^{3}H、^{14}C 不够灵敏，使用**液体闪烁计数**(liquid scintillation counting)可避免这一限制。这种技术将 β 发射样品溶于含荧光分子的溶液中，β 粒子引起荧光剂发光，可用光学方法进行探测。**闪烁计数器**(scintillation counter)用以探测发射 γ 射线的放射性物质。γ 射线从计数器的 NaI 晶体上逐出电子，这些电子诱导的荧光就可被测量。在**放射自显影**(autoradiography)中，放射性物质固定在纸上、琼脂糖凝胶或聚丙烯酰胺凝胶中，通过对 X 射线胶片的感光和显影，就可探测它们(显影胶片上的黑色区域对应放射性曝光区域)。也可制备薄层组织，用于**显微放射照相术**(microradiography)，在样品表面涂上一层感光乳剂并在显微镜下检测显影的乳剂。用电子学方法代替胶片，测量固体样品放射性的设备，具有数字化的结果和多次曝光(相反，胶片仅能显影一次)的优点。

使用放射性同位素作分子标记也存在弊端。首先，使用材料有潜在的致突变危险(辐照可导致 DNA 损伤)；再者，放射性的实验材料(样品和器皿)必须妥善处理，不然它们就会导致污染，引起后续测量的误差和危害健康。闪烁液由于其所需的体积大(且主要由有机溶剂组成)而存在处理上的特殊问题。前文表中显示，短寿命放射核(如^{32}P、^{35}S 和^{125}I)的处理主要可通过存储来解决，即保存放射性材料，直到其放射性衰变至可忽略的水平为止。而长寿命品种(如^{3}H 和^{14}C)的安全处理，则是一个难以在任何短时期内就能解决的问题。这就是为什么基于化学标记或荧光化合物的分子标记技术变得越来越流行的原因。

在包含单一反应物的二级反应：2A→P 中，[A]随时间的变化与一级反应大不相同。将方程 12-2 重排，并在与一级反应相同的范围内积分得：　326

$$\int_{[A_0]}^{[A]} -\frac{d[A]}{[A]^2} = k\int_0^t dt \qquad [12\text{-}10]$$

这样

$$\frac{1}{[A]} = \frac{1}{[A]_0} + kt \qquad [12\text{-}11]$$

方程 12-11 是一个表示变量 1/[A]和 t 的关系的线性方程。二级反应的半衰期为 $t_{1/2} = 1/k[A]_0$，所以它与一级反应相反，决定于初始反应物浓度。以 ln[A]对 t 和以 1/[A]对 t 作图，观

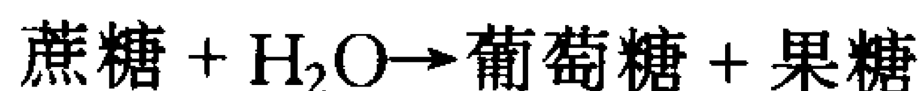
察哪一个是直线(如果有的话),则方程 12-6 和 12-11 可用以区分一级反应与二级反应。

为了实验测定二级反应 A + B→P 的速率常数,增加一种反应物相对于另一种反应物的浓度,常常是很方便的,如[B]>>[A]。在这样的条件下,[B]在反应过程中无明显变化,于是反应速率仅取决于[A],即取决于以有限量存在的反应物浓度。这样,反应对 A 来说可视为一级反应,因而称为**准一级**(pseudo-first-order)反应。当[A]>>[B]时,反应对 B 来说可视为一级反应。

B. 酶动力学

酶利用 6 种基本催化机制的不同组合,催化大量各种类型的反应(节 11-3)。有些酶仅作用于单底物分子,另一些作用于双底物或更多不同的底物分子,其结合顺序可以是严格的,也可以不是。有些酶与其底物形成共价结合的中间态复合物,有些则不这样。*然而对所有酶都可进行分析,以使其反应速率和总效率能够量化。*

酶动力学研究开始于 1902 年,Adrian Brown 利用酵母 **β-呋喃果糖苷酶**(β-fructofuranosidase)对蔗糖水解速率进行研究:



$$蔗糖 + H_2O \rightarrow 葡萄糖 + 果糖$$

Brown 发现,当蔗糖浓度高远于酶浓度时,反应速率变得与蔗糖浓度无关,即对蔗糖来说速率为**零级**(zero order)。于是他提出,总反应是由两个基本反应组成的,其中底物先与酶形成复合物,随后,复合物分解生成产物和酶:



$$E + S \underset{k_{-1}}{\overset{k_1}{\rightleftharpoons}} ES \xrightarrow{k_2} P + E \qquad [12\text{-}12]$$

这里 E、S、ES 和 P 分别表示酶、底物、**酶-底物复合物**(enzyme-substrate complex)和产物。根据这一模型,当底物浓度足够高,将所有的酶都转变为 ES 形式时,反应第二步就成为限速反应,总反应速率对底物浓度的进一步升高变得不敏感了。

构成上述酶反应的各个基本反应由速率常数来表征:k_1 和 k_{-1}是形成 ES 复合物(第一步反应)的正向和逆向反应速率常数,k_2 为 ES 分解成 P(第二步反应)的速率常数。为数学上简单起见,我们假定第二步反应是不可逆的。

327

Michaelis-Menten 方程

在一个复杂的动力学体系中,产物生成的速率可用产物生成反应的速率常数和产物生成前的瞬时中间态的浓度来表示。于是,反应 12-12 的速度(速率)一般表达式为:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES] \qquad [12\text{-}13]$$

ES 总的生成速率,是 ES 生成的基本反应和 ES 分解的基本反应速率之差:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES] \qquad [12\text{-}14]$$

然而这个方程若没有简化性假设,就不能直接积分。以下是两种可能的假设:

1) **平衡假设**(assumption of equilibrium)　1913 年,Leonor Michaelis 和 Maud Menten 在 Victor Henri 工作的基础上,假设 $k_{-1} >> k_2$,这样,反应第一步达到平衡。

$$K_s = \frac{k_{-1}}{k_1} = \frac{[E][S]}{[ES]} \qquad [12\text{-}15]$$

这里 K_s 为酶反应第一步的解离常数。利用这一假设,方程 12-14 就可积分了。尽管这

个假设常常是不正确的,但是为了承认这一先驱性工作的重要性,酶-底物复合物 ES 就称为 **Michaelis 复合物**。

2) **稳态假设**(assumption of steady state) 在通常生理条件下,底物浓度远超过酶浓度时([S]>>[E]),图 12-2 展示了参与反应 12-12 的各种物质浓度变化的历程曲线。除反应起始阶段外,该阶段一般在 E 和 S 混和的几微秒之内,[ES]保持近似常数,直至底物几乎耗尽。因而 ES 合成的速率,在反应的大部分历程中必定与其消耗的速率相等,亦即 ES 保持**稳(恒)态**(steady state),[ES]可以当作常数来处理:

$$\frac{d[\mathrm{ES}]}{dt} = 0 \qquad [12\text{-}16]$$

这种稳态假设是一种比平衡假设更为普遍的情形,是由 G. E. Briggs 和 John B. S. Haldane 于 1925 年首先提出的。

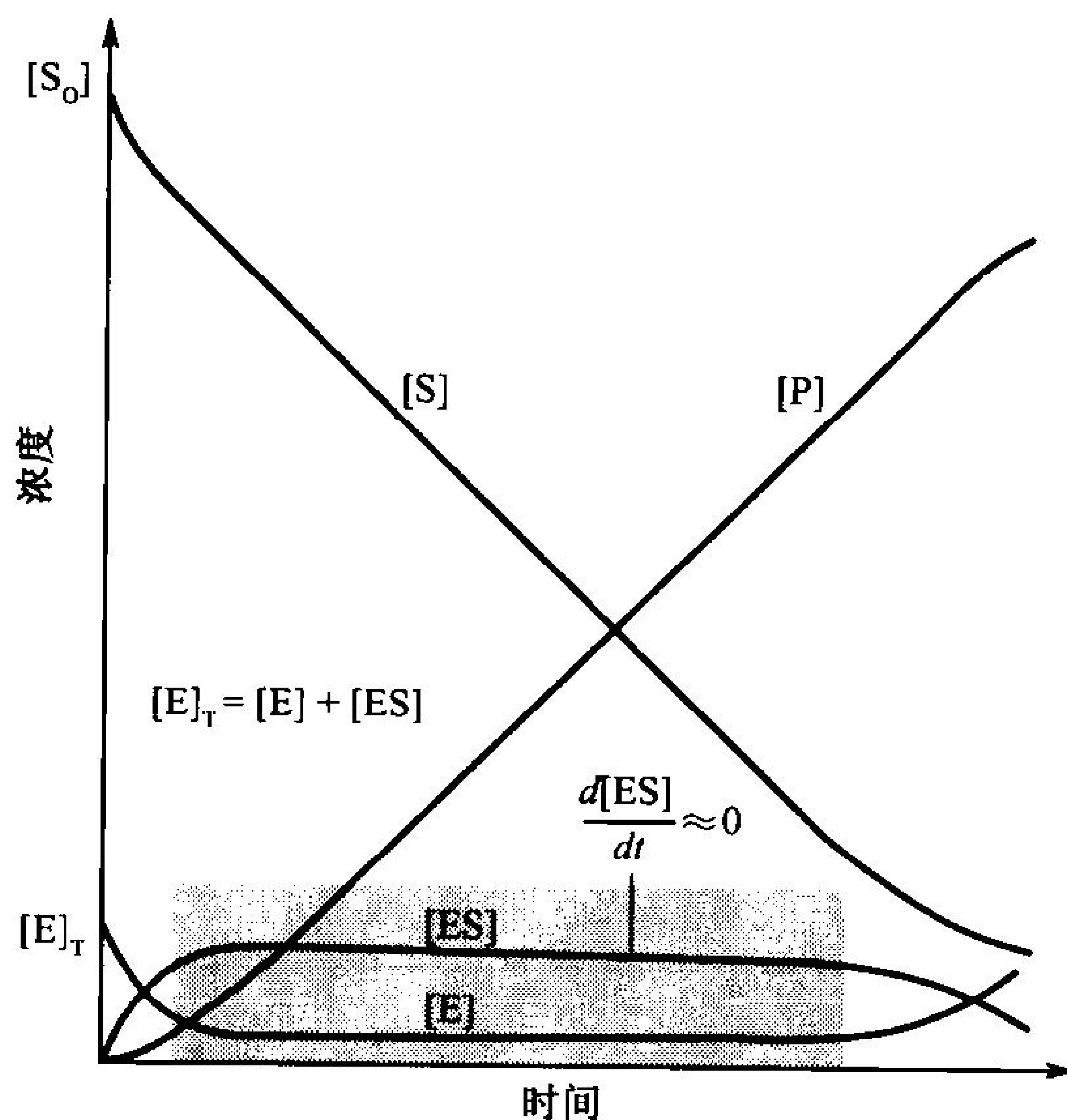


图 12-2 酶催化简单反应的历程曲线

除反应初始相(阴影块之前)外,只要[S]>>[E](阴影区),[E]和[ES]的历程曲线的斜率就基本为零。[引自 Segel, I. H., Enzyme Kinetics, p.27, Wiley(1975)]

为方便实用起见,对总反应的动力学表述必须用实验可测的量构成公式。[ES]和[E]一般都不能直接测量,但酶的总浓度:

328

$$[\mathrm{E}]_{\mathrm{T}} = [\mathrm{E}] + [\mathrm{ES}] \qquad [12\text{-}17]$$

通常都已决定,这样就可导出总的酶反应的速率方程。先将方程 12-14 与稳态假设(方程 12-16)合并给出:

$$k_1[\mathrm{E}][\mathrm{S}] = k_{-1}[\mathrm{ES}] + k_2[\mathrm{ES}] \qquad [12\text{-}18]$$

将$[\mathrm{E}]=[\mathrm{E}]_{\mathrm{T}}-[\mathrm{ES}]$代入,并整理上述方程得:

$$\frac{([\mathrm{E}]_{\mathrm{T}} - [\mathrm{ES}])[\mathrm{S}]}{[\mathrm{ES}]} = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \qquad [12\text{-}19]$$

定义**米氏常数**(Michaelis constant)K_M 为:

$$K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \quad [12\text{-}20]$$

这样由方程 12-19 可得：

$$K_M[\mathrm{ES}] = ([\mathrm{E}]_\mathrm{T} - [\mathrm{ES}])[\mathrm{S}] \quad [12\text{-}21]$$

解出[ES]

$$[\mathrm{ES}] = \frac{[\mathrm{E}]_\mathrm{T}[\mathrm{S}]}{K_M + [\mathrm{S}]} \quad [12\text{-}22]$$

于是，反应**初始速度**(initial velocity, v_0)，即 t=0 时的速度(Eq. 12-13)表达式变为：

$$v_0 = \left(\frac{d[\mathrm{P}]}{dt}\right)_{t=0} = k_2[\mathrm{ES}] = \frac{k_2[\mathrm{E}]_\mathrm{T}[\mathrm{S}]}{K_M + [\mathrm{S}]} \quad [12\text{-}23]$$

$[\mathrm{E}]_\mathrm{T}$和[S]均为实验可测定的量。用初始速度(在实际操作中，取超过约 10%的底物转变为产物之前测定的速度)代替速度参量，使可逆反应、产物对酶的抑制以及酶逐渐失活等复杂因素的影响减至最少。(这也是为什么方程 12-12 中逆向反应速率可设为零的原因。)

反应的**最大速度**(maximal velocity) $V_{\max}$，发生在高底物浓度下，**酶被饱和**(saturated)时，即酶完全处于 ES 状态：

$$V_{\max} = k_2[\mathrm{E}]_\mathrm{T} \quad [12\text{-}24]$$

这样，结合方程 12-23 和 12-24 得到：

$$v_0 = \frac{V_{\max}[\mathrm{S}]}{K_M + [\mathrm{S}]} \quad [12\text{-}25]$$

这一表达式即 **Michaelis-Menten 方程**，是酶动力学的基本方程式，它描述一条如图 12-3 中所示的直角双曲线。氧与肌红蛋白结合的饱和函数(方程 7-3)有同样的代数形式。

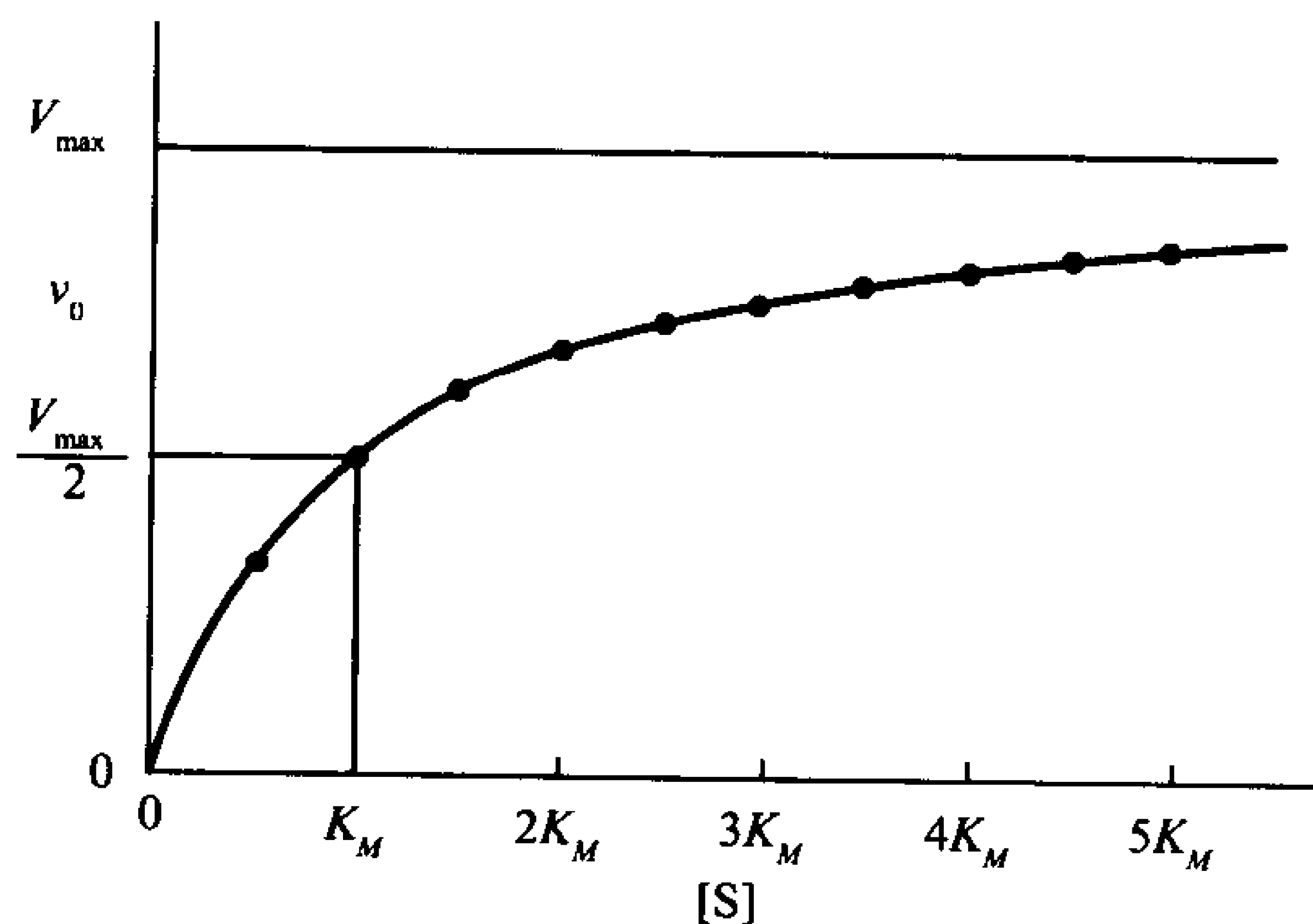


图 12-3 功能的秘诀：一个简单酶反应的初始速度，v_0 对底物浓度[S]作图。
图中各点为底物浓度 0.5～5K_M 范围内，以 0.5K_M 的间隔画出。

米氏常数的意义

米氏常数 K_M 有一个简单、实用的定义，当底物浓度[S] = K_M 时，由方程 12-25 可得 $v_0 = V_{\max}/2$，因此，K_M 是反应速度达到最大速度一半时的底物浓度。因而，如果一种酶的 K_M 值小，则它在低底物浓度下即可达到最大催化效率。

K_M 值对每一对酶-底物都是惟一的：不同底物与一给定的酶以不同 K_M 值相互作用，同样，

作用于同一底物的不同的酶也有不同的 K_M 值。K_M 的大小随酶特性及底物性质变化很大(表 12-1),它也是温度与 pH 的函数。米氏常数(方程 12-20)可表示为:

$$K_M = \frac{k_{-1}}{k_1} + \frac{k_2}{k_1} = K_s + \frac{k_2}{k_1} \qquad [12\text{-}26]$$

既然 K_s 是米氏复合物的解离常数,那么 K_s 减小时,酶对底物亲和性增加。只要 k_2/k_1 与 K_s 相比很小,即 $k_2 < k_{-1}$,反应 ES→P 比 ES 返回至 E + S 更慢,那么 K_M 也是酶对底物亲和性的一种度量。

K_{cat}/K_M 是催化效率的度量

我们可定义酶的**催化常数**(catalytic constant)k_{cat}为:

$$k_{cat} = \frac{V_{max}}{[E]_T} \qquad [12\text{-}27]$$

这个量也称为酶的**转化数**(turnover number),因为它是单位时间内每个活性中心催化的反应过程(转化)数。一部分酶的转化数已在表 12-1 中列出。

表 12-1　一些酶与底物的 K_M、k_{cat}和 k_{cat}/K_M 值

酶	底物	$K_M/(mol\cdot L^{-1})$	K_{cat}/s^{-1}	$K_{cat}/K_M/(mol\cdot L^{-1}\cdot s^{-1})$
乙酰胆碱酯酶	乙酰胆碱	9.5×10^{-5}	1.4×10^{4}	1.5×10^{8}
碳酸酐酶	CO_2	1.2×10^{-2}	1.0×10^{6}	8.3×10^{7}
	HCO_3^-	2.6×10^{-2}	4.0×10^{5}	1.5×10^{7}
过氧化氢酶	H_2O_2	2.5×10^{-2}	1.0×10^{7}	4.0×10^{8}
胰凝乳蛋白酶	*N*-乙酰甘氨酸乙酯	4.4×10^{-1}	5.1×10^{-2}	1.2×10^{-1}
	N-乙酰缬氨酸乙酯	8.8×10^{-2}	1.7×10^{-1}	1.9
	N-乙酰酪氨酸乙酯	6.6×10^{-4}	1.9×10^{2}	2.9×10^{5}
延胡索酸酶	延胡索酸	5.0×10^{-6}	8.0×10^{2}	1.6×10^{8}
	苹果酸	2.5×10^{-5}	9.0×10^{2}	3.6×10^{7}
脲酶	尿素	2.5×10^{-2}	1.0×10^{4}	4.0×10^{5}

注意,这些量的变化超过 8 个量级。方程 12-24 指出,对于简单系统,如 Michaelis Menten 模式反应(方程 12-12),$k_{cat} = k_2$。对于机制更复杂的酶(比如多底物,或多反应中间态),k_{cat}可以是数个速率常数的函数。

330

当[S]<<K_M时,形成极少的 ES,从而$[E]\approx[E]_T$。于是,方程 12-23 简化为二级速率方程:

$$v_0 \approx \left(\frac{k_2}{K_M}\right)[E]_T[S] \approx \left(\frac{k_{cat}}{K_M}\right)[E][S] \qquad [12\text{-}28]$$

这里 k_{cat}/K_M 是酶反应的表观二级速率常数,反应速率直接随溶液中酶与底物相互碰撞的频繁程度而变化。所以 *k_{cat}/K_M 就是酶催化效率的量度*。

331

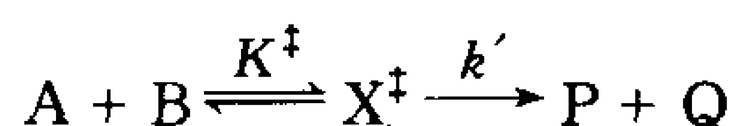
K_{cat}/K_M 值存在一个上限:它不可能大于 k_1,即,ES 至 E + P 的分解不可能比 E、S 碰撞形成 ES 更频繁。效率最高的酶其 k_{cat}/K_M 接近 10^8 至 $10^9 mol\cdot L^{-1}\cdot s^{-1}$的**扩散控制极限**(diffusion-controlled limit)。这些酶几乎每碰上一个底物分子,就催化一个反应,因而已经到达了有效催化

的极点。现在我们可以来认识催化速率与过渡态热力学之间的关系(见框 12-2)。

框 12-2 生物化学焦点

动力学与过渡态理论

反应速率与反应活化能(节 11-2)是如何相关的呢? 让我们考察一个按以下途径进行的双分子反应:



$$A + B \xrightleftharpoons{K^{\ddagger}} X^{\ddagger} \xrightarrow{k'} P + Q$$

$X^{\ddagger}$ 代表过渡态。反应速率表示为:

$$\frac{d[P]}{dt} = k[A][B] = k'[X^{\ddagger}] \quad [12\text{-}A]$$

k 为基本反应的普通速率常数,k' 为 $X^{\ddagger}$ 分解为产物的速率常数。

虽然 $X^{\ddagger}$ 不稳定,但可假定它与反应物处于快速平衡中,即:

$$K^{\ddagger} = \frac{[X^{\ddagger}]}{[A][B]} \quad [12\text{-}B]$$

$K^{\ddagger}$ 为平衡常数。过渡态理论的这一中心假设,允许我们将热力学强有力的公式应用于反应速率理论中。

既然 $K^{\ddagger}$ 是平衡常数,那么就可以表示为:

$$-RT\ln K^{\ddagger} = \Delta G^{\ddagger} \quad [12\text{-}C]$$

这里 T 为绝对温度,$R(8.3145 J \cdot K^{-1} mol^{-1})$ 为气体常数(该平衡常数与自由能的关系在节 1-4D 中导出)。合并前 3 个方程得:

$$\frac{d[P]}{dt} = k' e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT}[A][B] \quad [12\text{-}D]$$

上述方程表明,反应速率不仅决定于反应物浓度,而且随 $\Delta G^{\ddagger}$ 呈指数下降。所以*过渡态与反应物之间自由能差越大,即过渡态越不稳定,反应进行得越慢*。

现在我们必须计算 k',即 $X^{\ddagger}$ 分解的速率。过渡态结果一般认为是由非常弱的键维持的,该弱键在首次振动漂移中即断裂开来。由此,k' 表示为:

$$k' = \kappa v \quad [12\text{-}E]$$

v 为当 $X^{\ddagger}$ 分解为产物时断裂的键的振动频率,κ 为**转变系数**(transmission constant),即 $X^{\ddagger}$ 向产物形成方向而非返回反应物方向裂解的概率,对多数自发过程,κ 被假设为 1.0(这个数尽管很难确切计算,但必定在 0 与 1 之间)。

Planck 定律指出:

$$v = \varepsilon / h \quad [12\text{-}F]$$

在这种情况下,ε 为导致 $X^{\ddagger}$ 分解的平均振动能量,$h(=6.6261 \times 10^{-34} J \cdot S)$ 为**普朗克常数**(Planck's constant)。统计力学告诉我们,在温度 T,一个振子的经典能量为:

$$\varepsilon = k_B T \quad [12\text{-}G]$$

$k_B(=1.3807 \times 10^{-23} J \cdot K^{-1})$ 为**波尔兹曼常数**(Boltzmann constant),$k_B T$ 实质上为可得到的热能。结合方程 12-E 至 12-G 得出:

$$k' = \frac{k_B T}{h} \quad [12\text{-}H]$$

这样,结合方程 12-A、12-D 和 12-H 得出基本反应的速率常数表达式:

$$k = \frac{k_B T}{h} e^{-\Delta G^{\ddagger}/RT} \quad [12\text{-}I]$$

这个方程表明,当温度升高时,有更多的热能促进反应复合物跃过活化屏障,反应速度增加。

C. 动力学数据分析

决定 Michaelis-Menten 方程参数(即 V_{max}和 K_M)值的方法有好几种。在[S]很高时,初始速度 v_0 渐渐接近 V_{max}。然而实际上如图 12-3 所示,直接以 v_0 对[S]作图很难精确估测 V_{max}值,因为即使在底物浓度高达[S] = $10K_M$ 时,从方程 12-25 可知 v_0 仅为 V_{max}的 91%,这样,V_{max}值将几乎肯定是被低估的。

一个测定 V_{max}与 K_M 值的更好的方法是 Hans Lineweaver 和 Dean Burk 导出的。该方法使用 Michaelis-Menten 方程(方程 12-25)的倒数形式:

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{K_M}{V_{max}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad [12\text{-}29]$$

对 $1/v_0$ 和 $1/[S]$而言,这是一个线性方程。$1/v_0$ 若对 $1/[S]$作图,得到所谓 **Lineweaver-Burk 图,或双倒数作图**(double-reciprocal plot),直线的斜率为 K_M/V_{max},$1/v_0$ 上的截矩就是 $1/V_{max}$,$1/[S]$上的外推截矩则为 $-1/K_M$(图 12-4)。

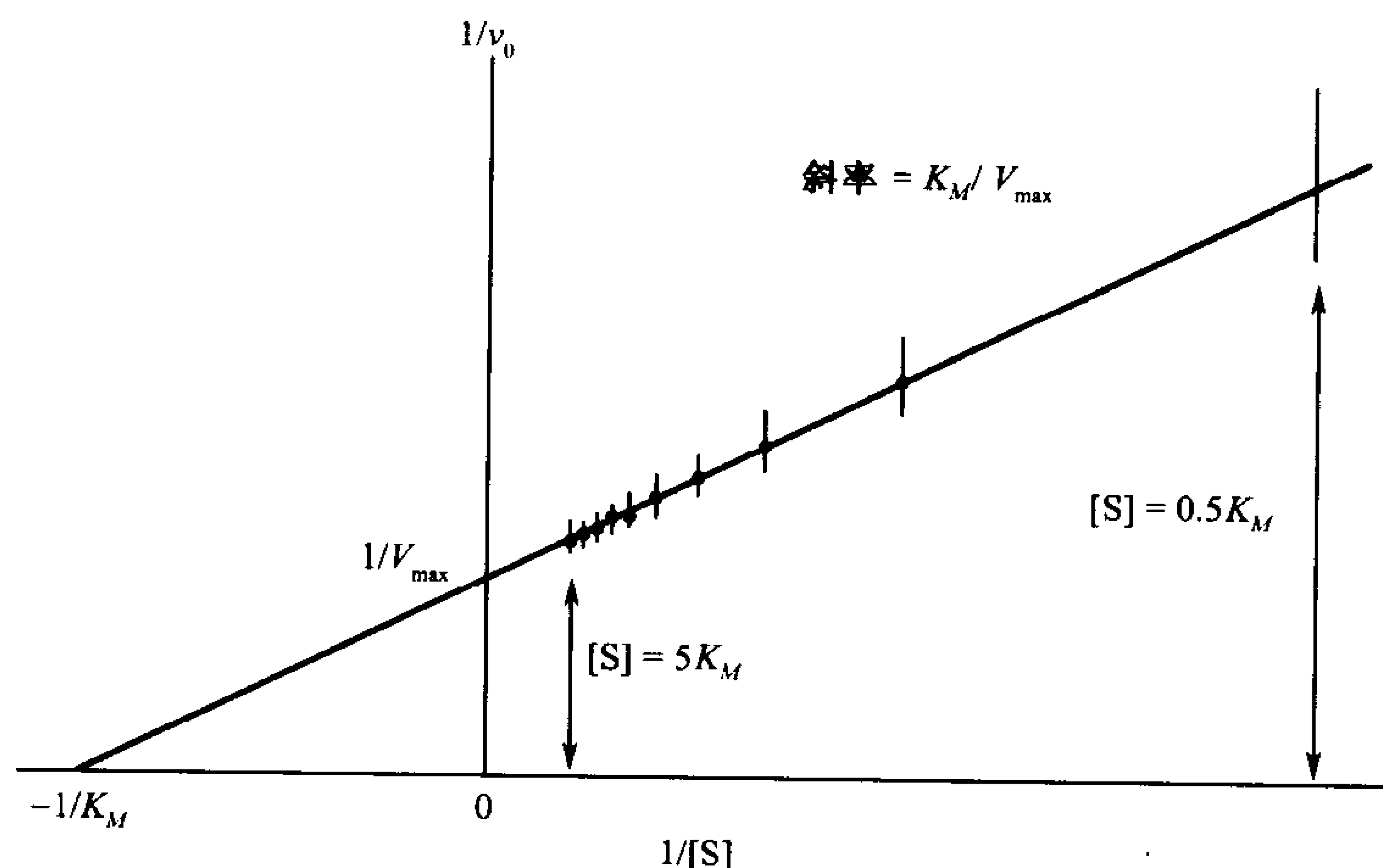


图 12-4　功能的秘诀:双倒数(Lineweaver-Burk)作图

误差线段代表 ±0.05 V_{max},标出的点与图 12-3 中相同。请注意小[S](大 1/[S])时,小误差的大效应,并注意大[S]时,数据点都拥挤在一起。

如图 12-3 所示,动力学数据的最佳测定是在[S]为约 0.5～5K_M 范围内收集所得的数据。因而 Lineweaver-Burk 图的缺点在于多数[S]的实验测量值挤在图的左侧(图 12-4)。不仅如此,在小[S]值时,v_0 的小误差会导致 $1/v_0$ 的大误差,因而产生 K_M 和 V_{max}的大误差。

332

其他几种形式的作图各有利弊,也能用于由动力学数据来测定 K_M 和 V_{max}。然而动力学数据现在通常都应用数学上很复杂的统计方法,由计算机来分析。尽管这样,Lineweaver-Burk 作图对动力学数据的直观展示还是有价值的。

实例计算

由下列数据决定酶的 K_M 和 V_{max}：

$[S]/(mmol·L^{-1})$	$v_0/(\mu mol·L^{-1}·s^{-1})$
1	2.5
2	4.0
5	6.3
10	7.6
20	9.0

首先，将数据转变为倒数形式($1/[S]$以$(mmol·L^{-1})^{-1}$为单位，$1/v_0$ 以(μ $mol·L^{-1}·s$)为单位)。接着，以$1/v_0$对 $1/[S]$作图。x 和 y 轴上的截距可由目测，或用线性回归来计算。根据方程 12-29 和图 12-4，y 轴截矩为约 $0.1(\mu mol·L^{-1})^{-1}·s$ 对应于 $1/V_{max}$，这样，V_{max}(y 轴截矩的倒数)则为 $10\mu mol·L^{-1}·s^{-1}$。x 轴截矩为 $-0.33(m\ mol·L^{-1})^{-1}$，应等于 $-1/K_M$，故 K_M(x 轴截矩的负倒数)为 $3.0mmol·L^{-1}$。

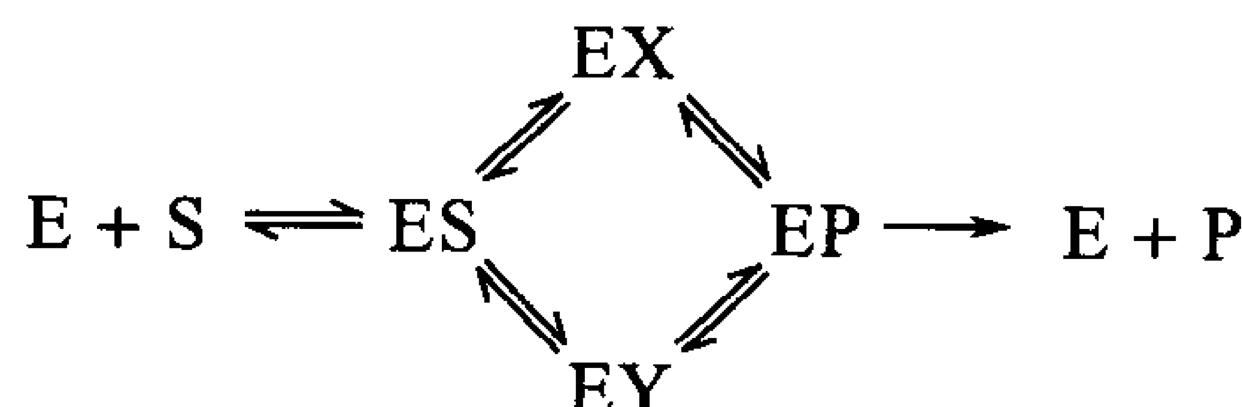
稳态动力学不能明确地建立反应机制

虽然稳态动力学提供了有关 ES 形成和裂解速率的有用信息，但对 ES 性质的内涵探究甚少。实际上，一个酶反应可以经过数个较为稳定的中间态，如：



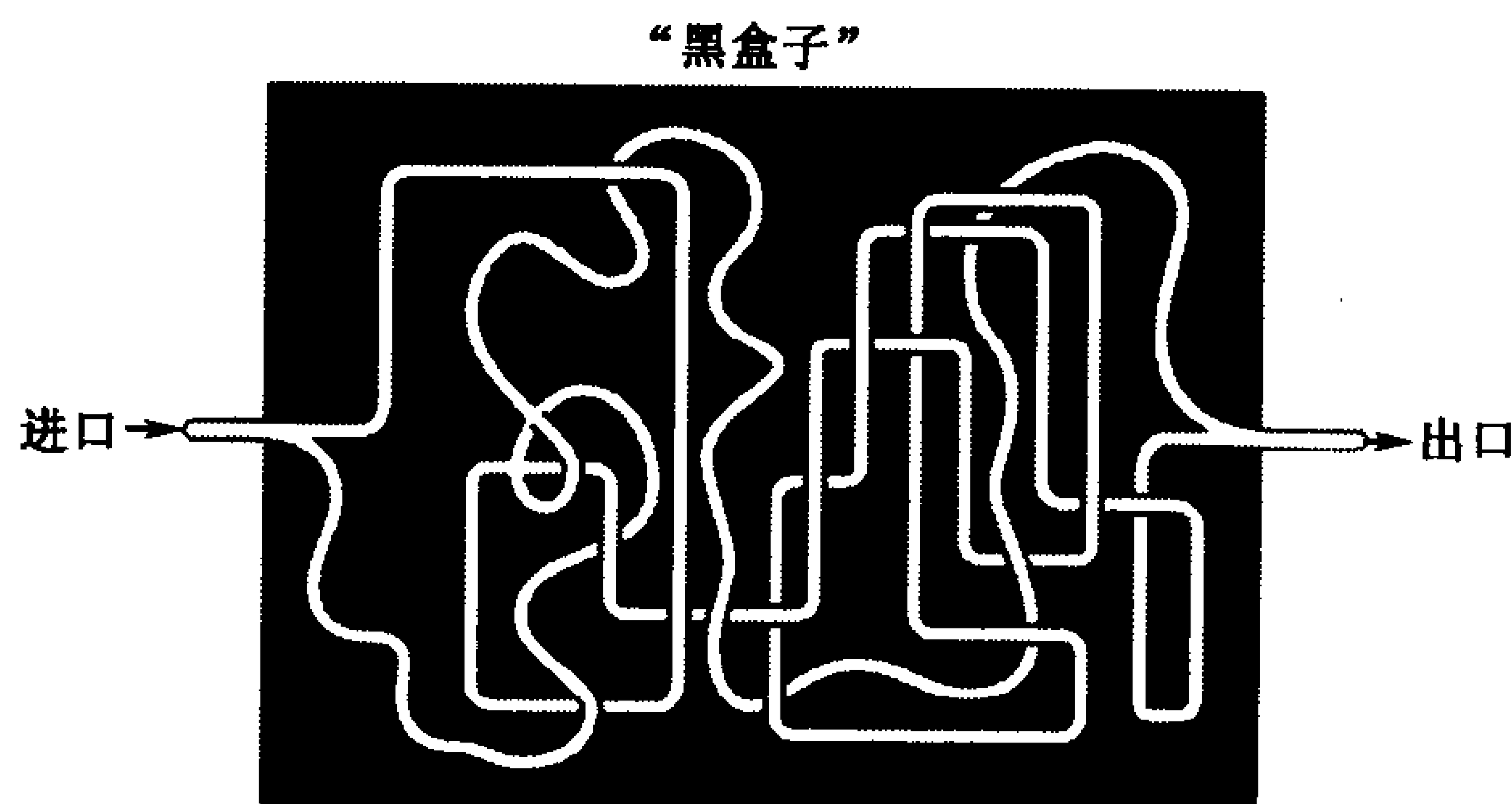
$$E + S \rightleftharpoons ES \rightleftharpoons EX \rightleftharpoons EP \rightleftharpoons E + P$$

或者沿更复杂的路径，如：



可惜稳态动力学测量无法揭示在酶催化反应中中间态的个数。所以这种多步反应的测量可以比作一只“黑盒子”，里边装着含有进水口和出水口的水管系统。

“黑盒子”

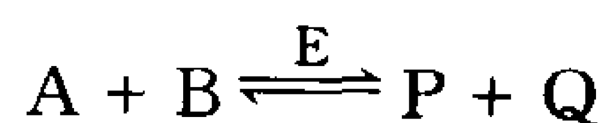


在稳态，即管道充满水后，输入水压与输出水流的关系是可测的，但这样的测量并没有提供任何有关连接入水口至出水口管道的具体构成的信息。这就需要额外的信息，例如打开盒子、跟踪管道走向。类似地，稳态动力学测量能够给出酶学行为的现象性描述，但不能决定中间态的性质，中间态的存在必须独立证实，例如利用光谱学技术来鉴定。

上述内容突出了酶学的一个中心原则：*反应的稳态动力学分析不能确切地建立其机制*。这是因为不管假设的机制多简单、多精致或多合理，总存在无数种其他的机制，也能解释这些动力学数据。通常认为更简单精致的机制应是正确的，但也并不总是这样。然而，*如果动力学数据与所给机制不一致，那么该机制必须被否定*。因此，虽然在没有确切数据如中间态存在的物理证明的情况下，动力学不能用于确切地建立一个机制，但反应的稳态动力学分析还是很有价值的，因为它可用以排除所提出的机制。　333

D. 双底物反应

在此之前我们已讨论了遵从 Michaelis-Menten 模型(反应 12-12)的简单单底物反应。然而，需要多个底物并产生多种产物的酶反应更为普遍。实际上，包含两个底物并产生两种产物的反应



$$A + B \overset{E}{\rightleftharpoons} P + Q$$

占已知生物化学反应的约 60%。几乎所有这些**双底物反应**(bisubstrate reaction)都归属于两类反应，它们或者是**转移酶**(transferase)反应，或者是氧化还原反应。在转移酶反应中，酶催化一个特定功能基团 X 从一个底物向另一个底物转移：



$$P{-}X + B \overset{E}{\rightleftharpoons} P + B - X$$

在氧化还原反应中，还原等价物在两底物之间转移。例如，胰蛋白酶(节 11-5)对肽键的水解是将肽羰基从肽氮原子转移到水分子上(图 12-5a)，而在醇脱氢酶反应中(节 11-1B)，一个氢以阴离子形式上从乙醇转移到 NAD^+ 上(图 12-5b)。虽然双底物反应原则上可通过很多种机制发生，但仅有几类是常见的。

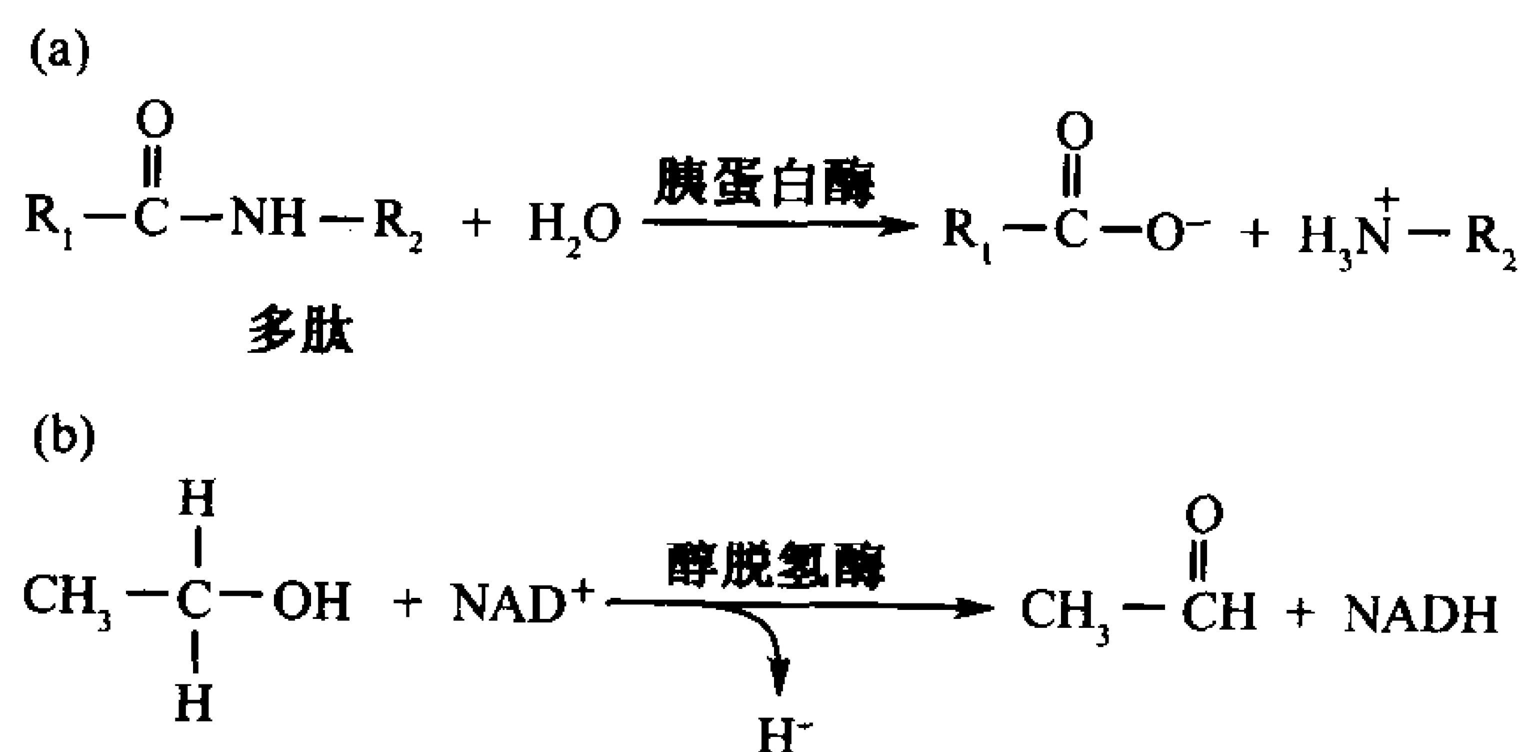


图 12-5　一些双底物反应

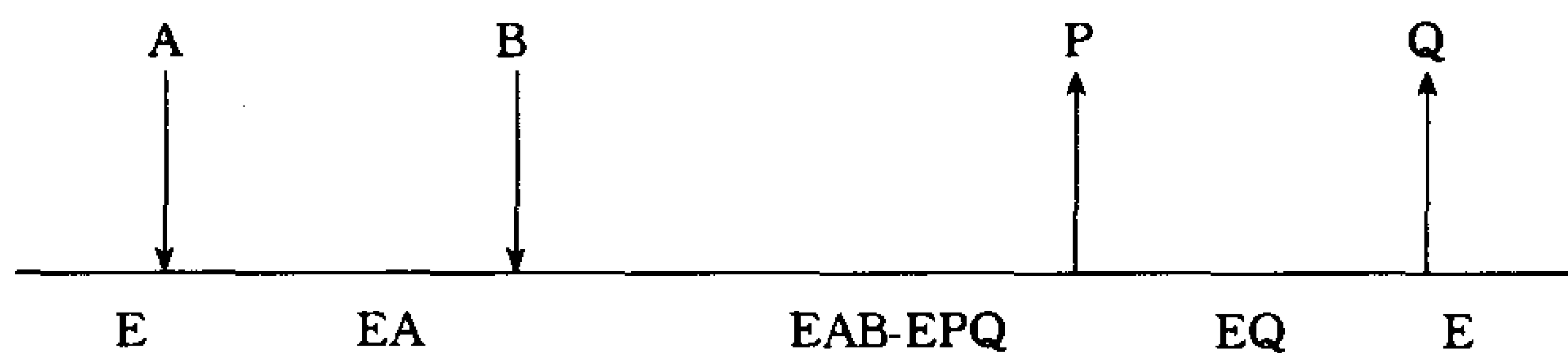
(a) 在胰蛋白酶催化的肽水解反应中，肽羰基与连着的多肽侧链 R_1 从肽氮原子转移到水分子上。(b) 在醇脱氢酶反应中，一个氢阴离子从乙醇转移到 NAD^+ 上。

顺序反应

*所有底物都必须与酶结合后才发生反应而释放产物的反应称为***顺序反应**(sequential reaction)。在这类反应中，被转移的基团 X 直接从 A(=P—X)移到 B 上，产生 P 和 Q(=B—X)。因而这类反应也称**单置换反应**(single displacement reaction)。

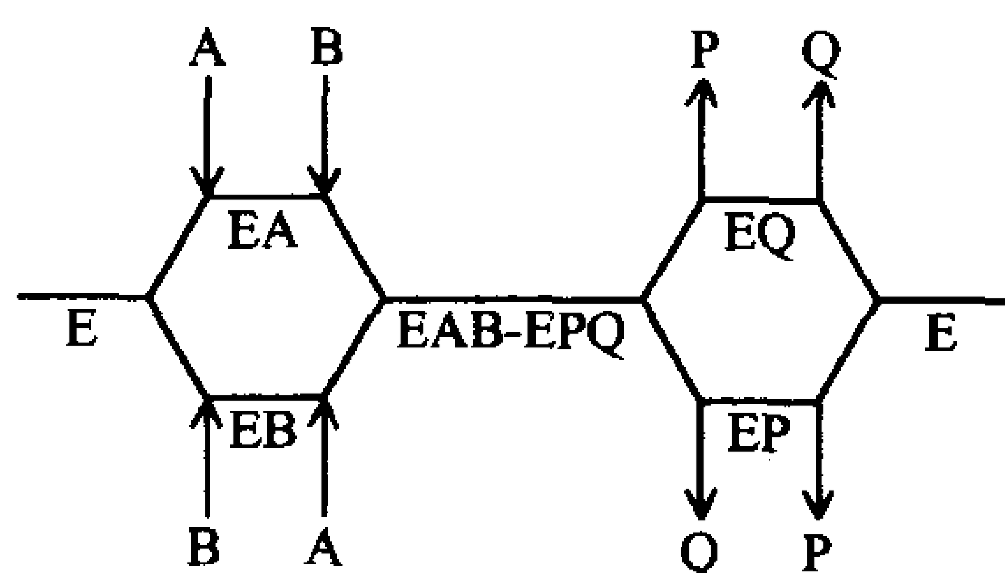
顺序反应可再分为两类，一类反应底物以强制的顺序加载到酶上，称为**有序机制**(ordered mechanism)；另一类底物结合无优先顺序，称为**随机机制**(random mechamism)。在有序机制中，第一个底物的结合，对酶形成第二个底物的结合位点显然是必需的，而在随机机制中，两结合位点都在自由酶分子上。　334

在 W. W. Cleland 发展的一种标志法中，底物按加到酶上的顺序被指定为字母 A 和 B，产物以离开酶的顺序被指定为 P 和 Q，将酶表示为一条水平线，垂直箭头代表底物连续地加载和产物连续地释放。于是，有序双底物反应可图示为：



其中 A 和 B 分别称为**先导底物**(leading substrate)和**后随底物**(following substrate)。许多 NAD^+ 和 $NADP^+$ 依赖的脱氢酶，均遵循有序双底物机制，其辅酶为先导底物。

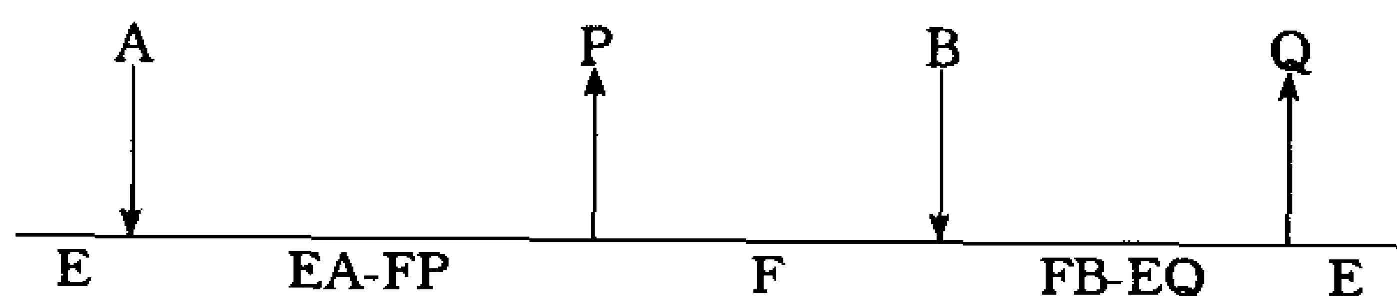
随机双底物反应图示为：



一些脱氢酶和激酶以随机双底物机制起作用。

乒乓反应

*在所有底物都加载到酶上以前，就释放单产物或多产物的基团转移反应，称为*乒乓反应(Ping Pong reaction)。乒乓双底物反应表示为：



这里，第一个底物 A(＝P—X)的功能基团 X，被酶 E 从底物上置换下来产生第一个产物 P 和稳定的酶形式 F(＝E—X)，其中 X 紧紧束缚(常为共价结合)在酶上(乒)。在反应的第二步，X 被第二个底物 B 从酶上替换下来，产生第二个产物 Q(＝B—X)，从而再生了酶的原始形式 E(乓)。所以这类反应也称为**双置换反应**(double-displacement reaction)。*注意在乒乓反应中，底物 A 和 B 彼此并不在酶表面相碰。*许多酶，如胰蛋白酶(其中，F 是酰基-酶中间物；节 11－5)、氨基转移酶和一些黄素酶以乒乓机制起作用。

335

双底物机制可用动力学测量来识别

描述上文中双底物机制的速率方程比单底物反应要复杂得多。事实上，双底物机制方程(已超出本书范围)，相对于含两个动力学常数(V_{max}和 K_M)的 Michaelis-Menten 方程来说，包含多达 4 个动力学常数。尽管如此，稳态动力学测量仍可用于分辨各种双底物机制。

2. 酶的抑制作用

许多物质通过与酶的可逆结合来影响酶活性，这种结合以影响底物结合和/或影响转化数的方式进行。*以该方式降低酶活性的物质称为*抑制剂(inhibitor)。现代医药库的大部分是由酶抑

制剂组成的。例如，AIDS 几乎都是用抑制病毒的某些酶活性的药物治疗的（见框 12-3）。

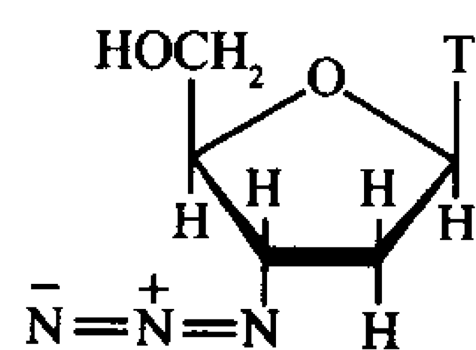
框 12-3　健康和疾病的生物化学

HIV 酶抑制剂

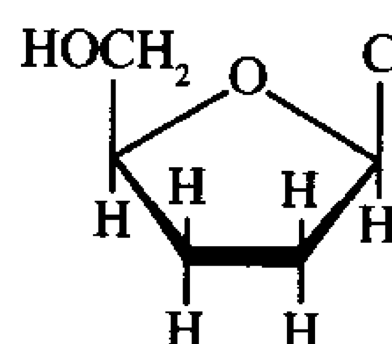
人类免疫缺陷型病毒（human immunodeficiency virus, HIV）通过感染和损坏宿主的免疫系统，引起**获得性免疫缺陷综合征**（acquired immunodeficiency syndrome, AIDS）。感染的第一步，HIV 附着在靶细胞上，并向宿主细胞注入遗传物质（是 RNA 而不是 DNA）。病毒 RNA 由被称为**反转录酶**（reverse transcriptase）的病毒酶转录成 DNA（框 24-2）。病毒 DNA 整合到宿主基因组中后，细胞就能产生更多的病毒 RNA 和蛋白质，以组装成新的病毒颗粒。多数病毒蛋白质是以更大的被称为**多聚蛋白**（polyprotein）前体的一部分被合成的。接着，病毒编码的 **HIV 蛋白酶**（HIV protease）水解并释放这些病毒蛋白质，这种蛋白水解过程对病毒的繁殖是必需的。在缺乏有效 HIV 疫苗的情况下，预防和治疗 AIDS 的努力促进了 HIV 反转录酶和 HIV 蛋白质抑制剂的开发。

迄今已开发得到数种反转录酶抑制剂，其原始型为 **AZT**[3′-叠氮-3′-脱氧胸苷（3′-azido-3′-deoxythymidine），**叠氮胸苷**（zidovudine）]，AZT 由细胞摄入、磷酸化并掺入以 HIV 为模板合成的 DNA 链中。因 AZT 少一个 3′-OH，起到终止链的作用，就像用于 DNA 测序的双脱氧核苷酸（节 3-4C）。多数细胞 DNA 聚合酶对磷酸化的 AZT 亲和性很低，但反转录酶对该药物有高亲和性，这就使得 AZT 可有效对抗病毒的复制。其他用于治疗 HIV 感染的核苷类似物为 **2′，3′-双脱氧胞苷**（ddC, zalcitabine）和 **2′，3′-双脱氧肌苷**（ddI, didanosine，肌苷核苷酸代谢转化为腺苷和鸟苷核苷酸），它们也作为链合成的终止剂。非核苷化合物如 nevirapine 不和反转录酶的活性中心结合，而结合在酶其他部位的一个疏水口袋上。

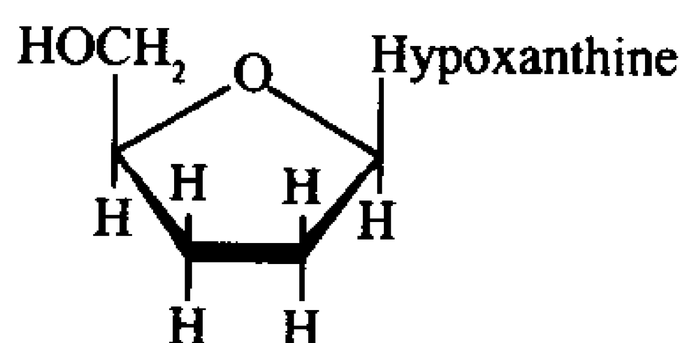
HIV 蛋白酶是一个同源二聚体，含两个 99 残基的亚基，机械地说，这是一类所谓的**天冬氨酸蛋白酶**（aspartic protease），是一个包括胃蛋白酶（pepsin）（在低 pH 起作用的胃蛋白酶）在内的蛋白酶家族。对多种天冬氨酸蛋白酶活性中心的比较，有助于 HIV 蛋白酶抑制剂的设计。HIV 蛋白酶断裂若干特异性肽键，包括其生理性底物 HIV 蛋白（见下图）中的 Phe-Pro 和 Tyr-Pro 肽键。因此基于这些序列设计的抑制剂，应可选择性地抑制病毒蛋白酶。**仿肽**（peptidomimetic）（模仿肽的）药物 ritonavir 和



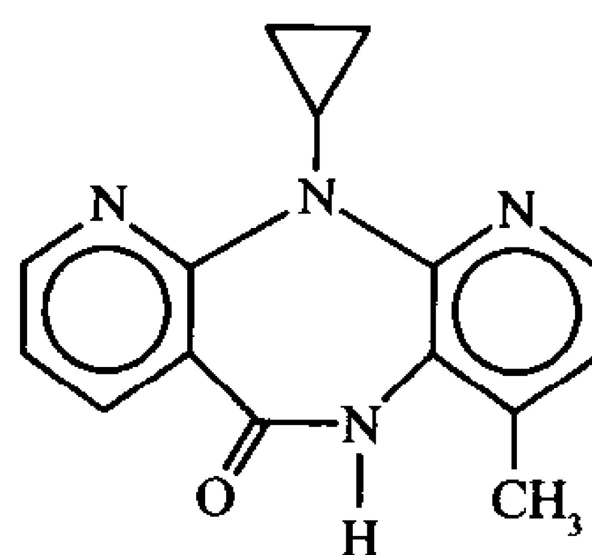
3′-叠氮-3′-脱氧胸苷
(AZT;叠氮胸苷)



2′,3′-双脱氧胞苷
(ddC, 双脱氧胞苷)

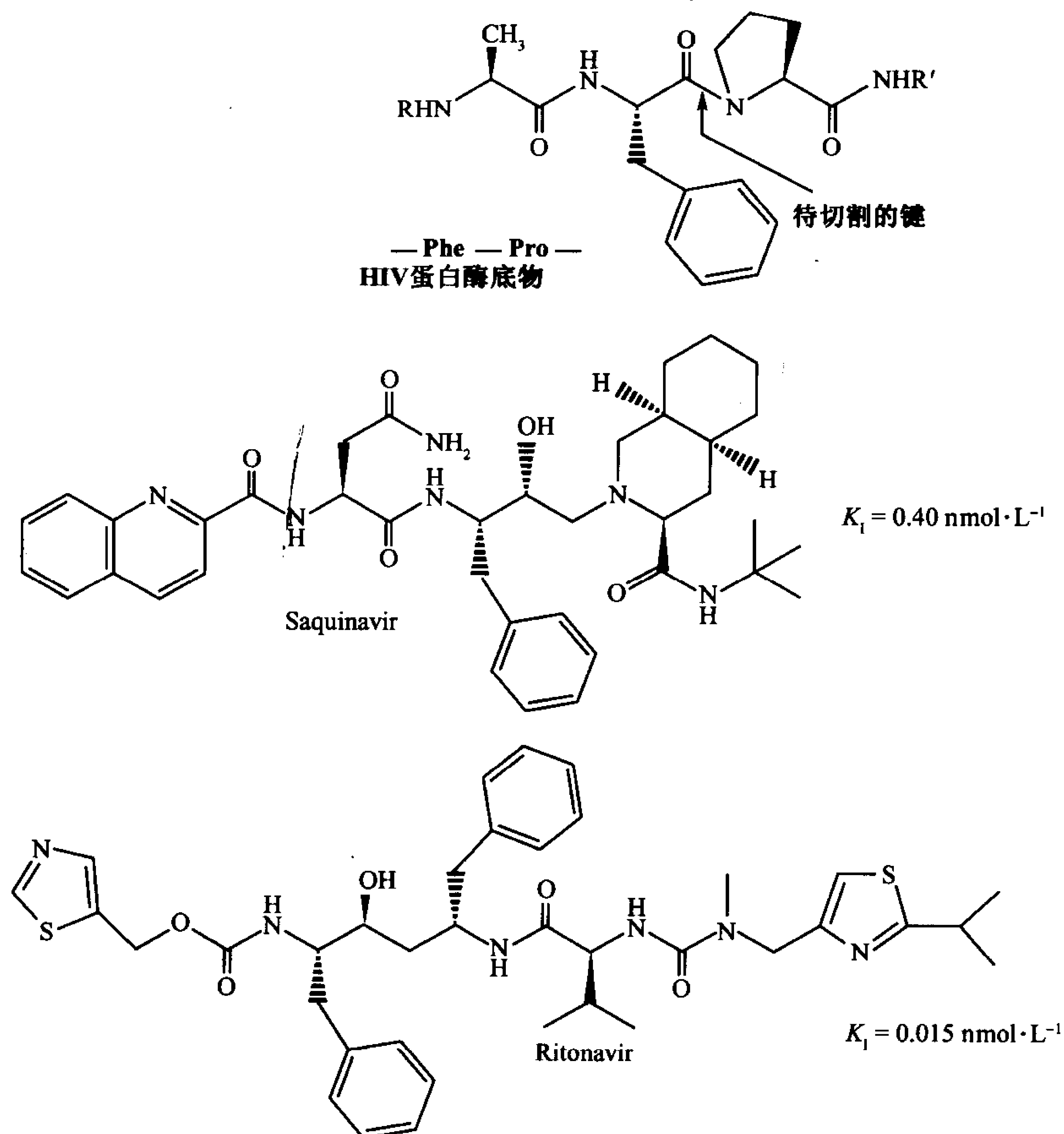


2′,3′-双脱氧肌苷
(ddI, 双脱氧肌苷)



nevirapine

saquinavir 含有可与 HIV 蛋白酶活性中心结合的苯基和其他体积大的基团。更重要的是，这些药物拥有催化反应的四面体过渡态（红色）的几何形状。图中展示了酶的肽底物，以便于比较。



抗 HIV 药物的功效与很多药物一样，受到数种因素的限制：

1）副作用　虽然抗 HIV 药物对病毒有选择性，但它们也干扰正常的细胞过程。例如，在迅速分化的细胞，如产生红细胞的骨髓细胞中，反转录酶抑制剂对 DNA 合成的抑制，可导致严重的贫血症。其他副作用包括恶心、肾结石和皮疹。副作用在 HIV 感染中特别麻烦，因为这些药物即使不是终身服用，也要每天数次，服用多年。

2）生物利用率　很多待选药物口服吸收很差，有些可被身体吸收的药物，也常常很快就被排泄，或常由肝脏化学修饰为失活形式（例如，含 HIV 靶序列的肽吸收很差，并被迅速水解，因而需要使用仿肽）。药物若是结合在血液蛋白质如**血清白蛋白**（serum albumin）上，就可以有较长的半衰期，但它们也必须进入靶细胞才能生效。例如，细胞摄取 AZT，但其磷酸化形式不能透过细胞膜。中枢神经系统特别难于成为靶目标，因为神经组织和支持它们的血管之间有几乎无法穿透的基质[即所谓**血脑屏障**（blood-brain barrier）]。

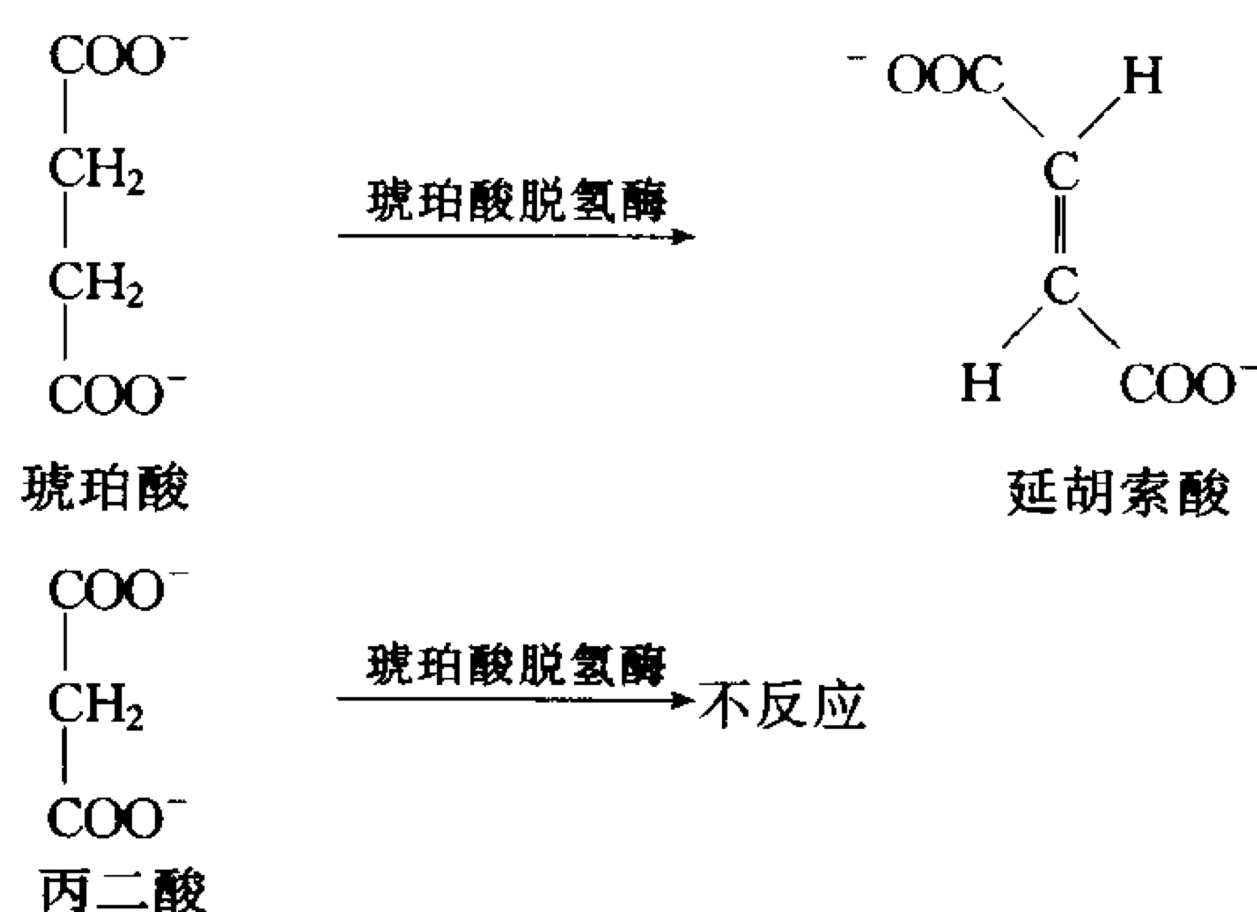
3）抗药性　抗病毒药物的获得性抗药性是 HIV 感染中的一个严重问题。因为反转录酶的错误倾向，可容许 HIV 迅速突变。已经知道 20 种 HIV 突变体与药物的抗药性有关。

在 HIV 感染的情况下，单一药物看来不可能成为一种“魔弹”。部分原因是 HIV 感染多种细胞类型，但主要原因还是其迅速获得对任何药物的抗药性能力。最新抗 HIV 治疗的突出成就在于组合治疗，即多种不同药物同时使用。这样做可使 HIV 水平降低，从而使之陷入困境。有时降至测不出的水平，减小了 HIV 发生抗药变体的可能性，由此成功地控制了 AIDS。应用含有反转录酶抑制剂和 HIV 蛋白酶抑制剂的“鸡尾酒”抑制剂有以下优点：①减小了病毒株自发产生对混合药物中每种化合物的抗性的可能性；②减小了单个化合物的剂量，因而也减小了其副作用。

抑制剂通过多种机制起作用。有些酶抑制剂的结构与酶的底物类似，但不与酶发生反应，或反应极慢。这些物质被普遍用来探测酶活性中心的化学性质和构象，以阐明酶的催化机制。另一些抑制剂影响酶活性，但并不干扰酶和其底物结合，很多两者兼有。在本节中，我们要探讨几种可逆性抑制的最简单的机制和它们对酶动力学行为的影响，这些酶都遵循 Michaelis-Menten 模型。

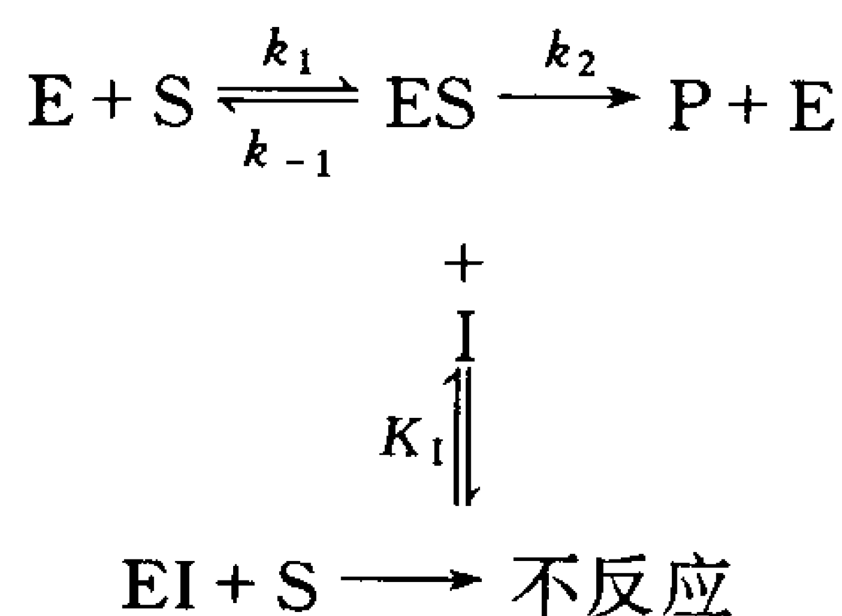
A. 竞争性抑制

与正常底物直接竞争酶底物结合位点的物质称为**竞争性抑制剂**(competitive inhibitor)。这种抑制剂通常与底物类似，因而可以特异地与活性中心结合。但与底物不同的是，它不能像底物那样起反应。例如**琥珀酸脱氢酶**(succinate dehydrogenase)是将**琥珀酸**(succinate)转化为**延胡索酸**(fumarate)(节 16－3F)的一个柠檬酸循环酶，它被**丙二酸**(malonate)竞争性抑制。丙二酸在结构上与琥珀酸类似，但不能被脱氢。



丙二酸作为琥珀酸脱氢酶竞争性抑制剂的效应作用有力地证明，该酶的底物结合位点必定要结合底物的两个羧基，可能是通过两个位置合适的正电荷残基的影响进行结合的。　336

竞争性抑制作用的一般模型可由以下反应体系给出：



这里，假设抑制剂 I 与酶可逆结合，并快速达到平衡，因此：

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \qquad [12\text{-}30]$$

酶-抑制剂复合物 EI 是无催化活性的。所以，竞争性抑制剂减小了可用于和底物结合的自由酶的浓度。

竞争性抑制反应的 Michaelis-Menten 方程推导方法同前(12-1B)，但$[E]_T$ 分量中多了一个结合 I 而形成的 EI 项($[E]_T = [E] + [ES] + [EI]$)，结果导出的方程为：　338

$$v_0 = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_M + [S]} \qquad [12\text{-}31]$$

这是一个被修饰了的 Michaelis-Menten 方程，修饰因子 α 定义为

$$\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I} \qquad [12\text{-}32]$$

注意，α 不会小于 1，它是抑制剂浓度和对酶亲和性的函数。

图 12-6 显示取不同 α 值时，方程 12-31 作图呈双曲线。注意当[S]趋于无穷大时，对任何 α 值 v_0 都趋近 V_{max}。所以，底物的极高浓度能克服抑制剂的效应(即抑制剂不影响酶的转化数)。I 存在时，使[S]表现得比其实际情况更稀释(使 K_M 显得比实际值更大)，这是 I、S 与 E 的结合相互排斥的结果。

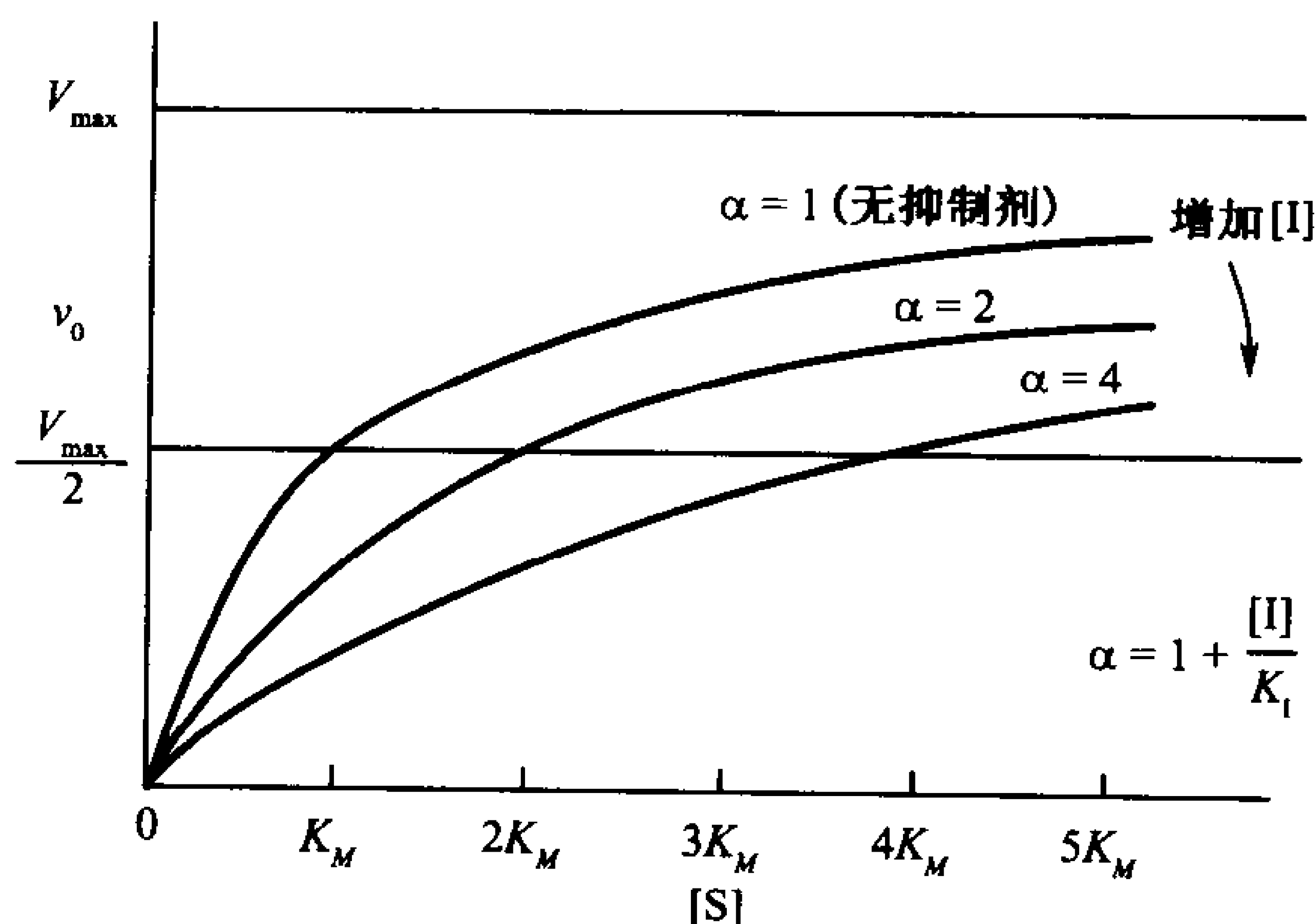


图 12-6 在不同浓度竞争性抑制剂存在的情况下，Michaelis-Menten 反应的 v_0 对[S]作图

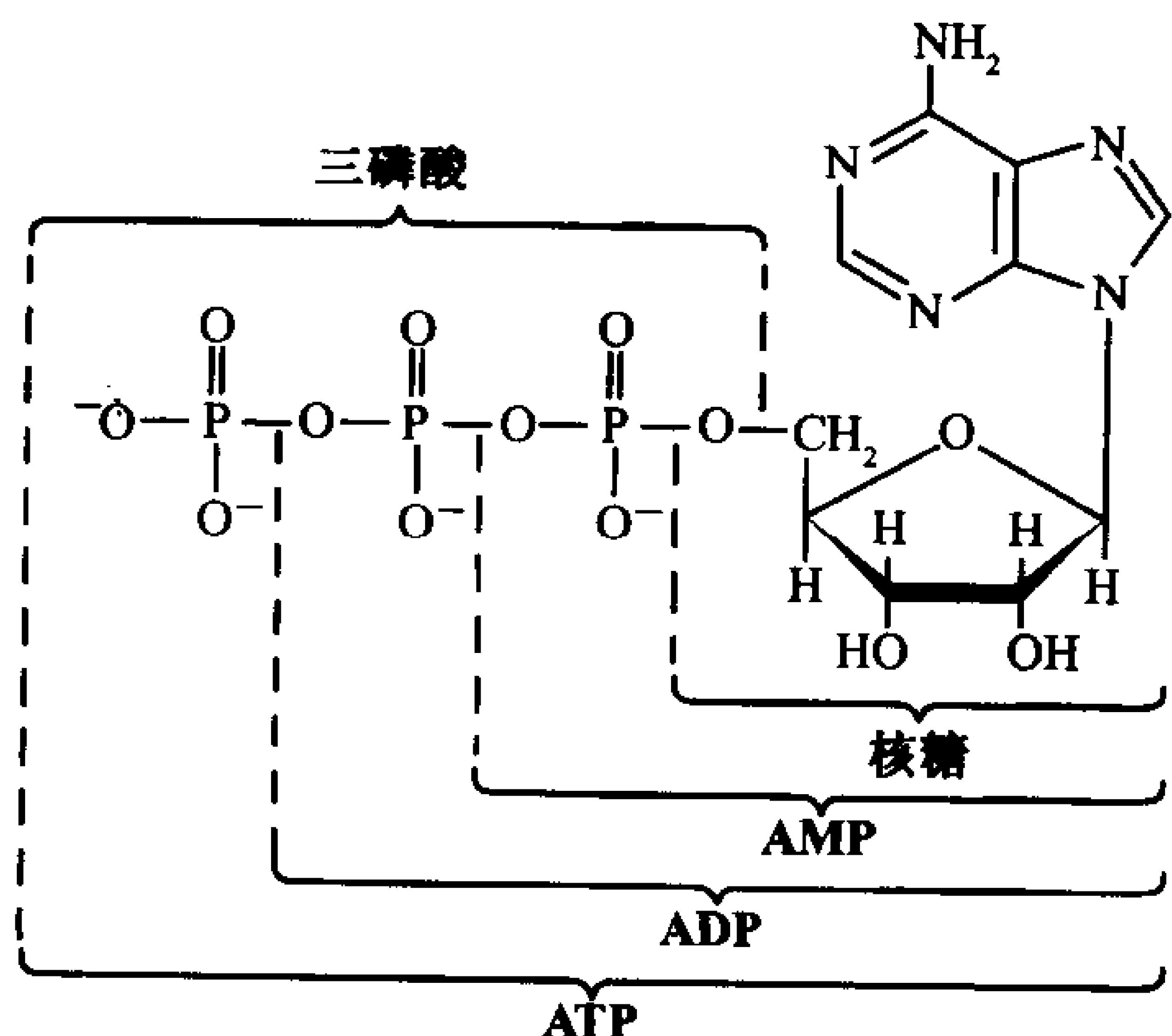
利用乙醇治疗甲醇中毒的原理，就是竞争性抑制作用。甲醇本身只有轻度毒性，但肝脏中的醇脱氢酶将它转变为高毒性的甲醛，只需少量甲醛即可导致失明和死亡。乙醇与甲醇竞争结合肝脏醇脱氢酶的活性中心，因而能减缓由甲醇产生甲醛(乙醇转变为很容易代谢掉的乙醛)。于是，通过服用乙醇，大部分甲醇将在转变成甲醛之前，就从尿中排出体外而不伤害人体。

可以测量的 K_I

以双倒数形式重排方程 12-31，得：

$$\frac{1}{v_0} = \left(\frac{\alpha K_M}{V_{max}}\right)\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}} \qquad [12\text{-}33]$$

339 该方程作图是线性的，其斜率为 $\alpha K_M/V_{max}$，1/[S]轴上的截矩为 $-1/\alpha K_M$，$1/v_0$ 轴上的截矩为 $1/V_{max}$(图 12-7)。不同 I 浓度下，竞争性抑制作用的双倒数作图，所得直线在 $1/v_0$ 轴上均交于 $1/V_{max}$，这是鉴别竞争性抑制作用的一个特征。



对已知 K_M 的酶，在不同抑制剂浓度下测定 α 值，即可由方程 12-32 求出 K_I 值。比较不同结构的竞争性抑制剂的 K_I 值，能提供有关酶活性中心结合性质的信息，因而也能提供其催化机制的信息。例如，为确证 ATP 分子中不同的区段对结合到 ATP 依赖性酶的活性中心的重要性，人们可以测定 ADP、AMP、核糖、三磷酸等的 K_I。由于这些 ATP 组成成

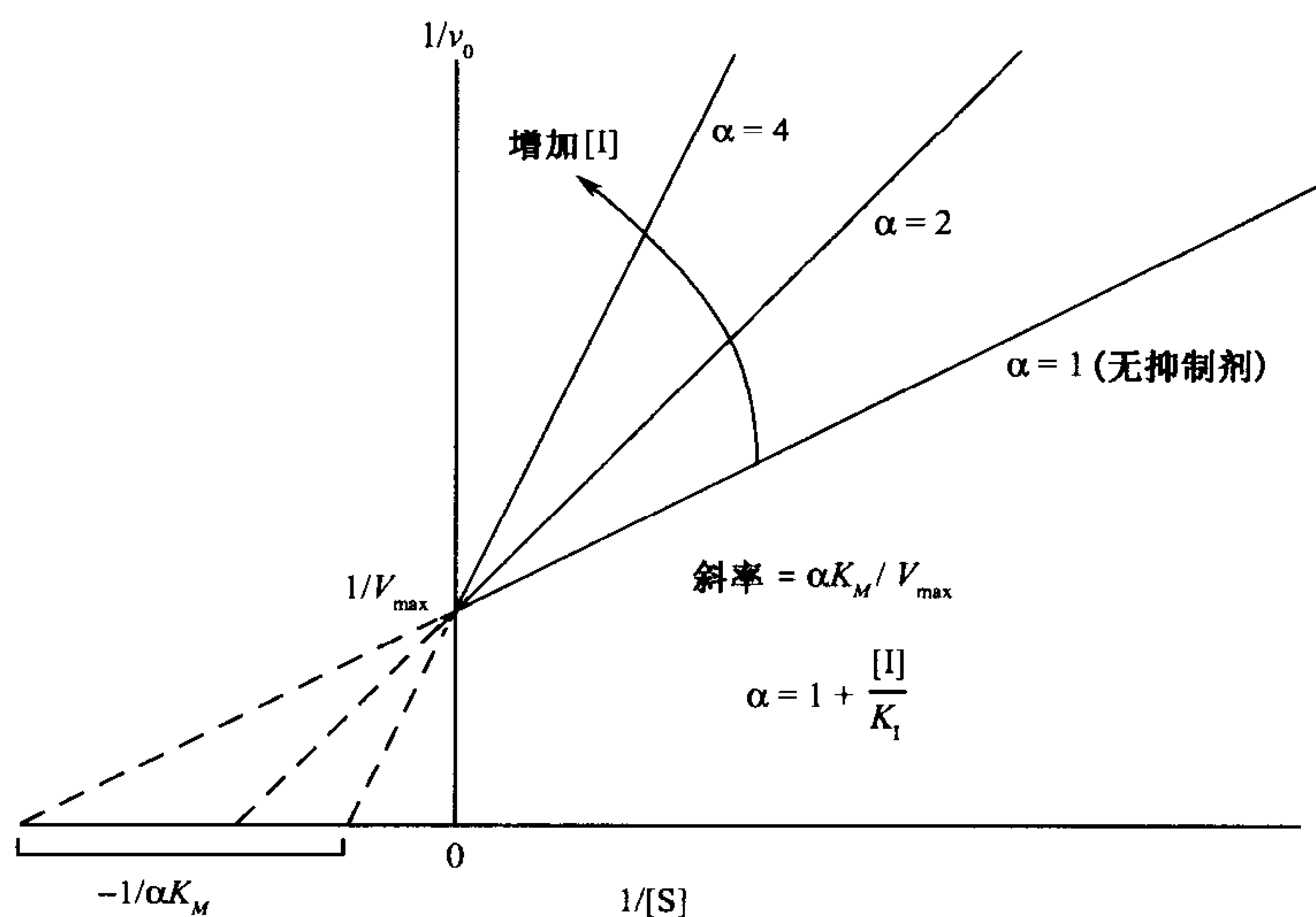


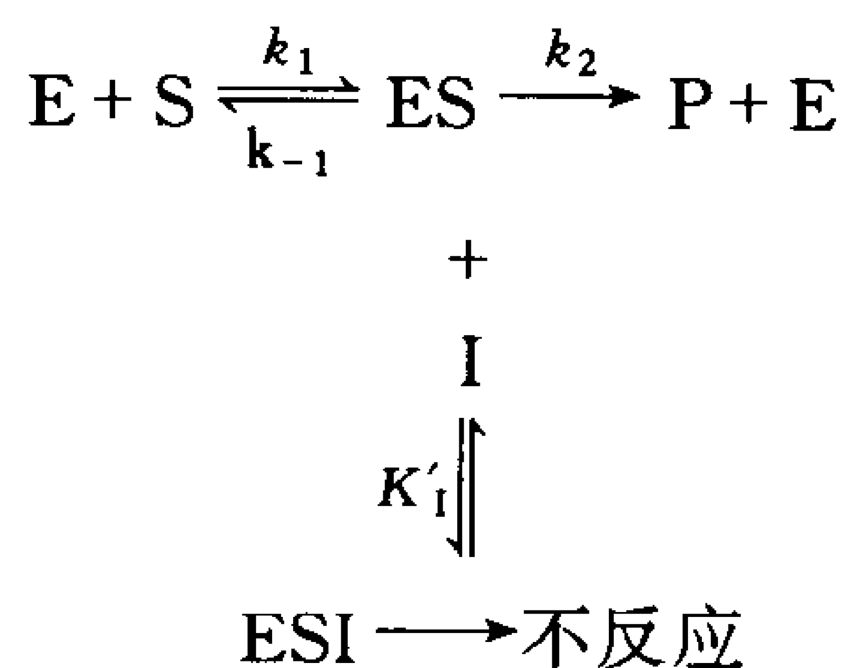
图 12-7　图 12-6 中所描述的被竞争性抑制 Michaelis-Menten 酶的 Linewearer-Burk 作图
注意，所有直线在 $1/v_0$ 轴上都交于 $1/V_{max}$，不同斜率表明抑制剂对 K_M 的效应

分很多都是不反应的，所以对抑制作用的研究不失为监测它们与酶结合的最方便的手段。

竞争性抑制作用研究也用于测定过渡态类似物对酶活性中心的亲和性(节 11-3F)。例如最近开发的 HIV 蛋白酶抑制剂(框 12-3)，就被设计成模仿该酶的过渡态，因而以高亲和性与酶结合。抑制剂研究是这类药物开发的主体。 340

B. 反竞争性抑制

在**反竞争性抑制**(uncompetitive inhibition)作用中，抑制剂直接结合到酶-底物复合物上，但不与自由酶结合：



在这种情况下，抑制剂结合步骤的解离常数为：

$$K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \tag{12-34}$$

反竞争性抑制剂不需与底物类似，它可能使活性中心变形，从而导致酶的催化失活。

反竞争性抑制作用的 Michaelis-Menten 方程及其双倒数作图方程列于表 12-2。双倒数作图由一组平行线构成(图 12-8)，其斜率为 K_M/V_{max}，$1/v_0$ 轴上的截矩为 α'/V_{max}，$1/[S]$轴上的截矩为 $-\alpha'/K_M$。注意，在反竞争性抑制作用中，K_M 和 V_{max}都减小，但 V_{max}/K_M 比值保持不变。与竞争性抑制作用相反，反竞争性抑制作用对 V_{max}的效应不因底物浓度的增加而逆转。

表 12-2 抑制剂对 Michaelis-Menten 反应的效应[a]

抑制作用的类型	*Michaelis-Menten* 方程	*Lineweaver-Burk* 方程	抑制剂效应
无	$v_o = \frac{V_{max}[S]}{K_M + [S]}$	$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{max}}\frac{1}{[S]} + \frac{1}{V_{max}}$	无
竞争型抑制	$v_o = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_M + [S]}$	$\frac{1}{v_o} = \frac{\alpha K_M}{V_{max}}\frac{1}{[S]}\frac{1}{V_{max}}$	K_M 增大
反竞争性抑制	$v_o = \frac{V_{max}[S]}{K_M + \alpha'[S]}$	$\frac{1}{v_o} = \frac{K_M}{V_{max}}\frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$	K_M and V_{max}减小
混合(非竞争)型抑制性	$v_o = \frac{V_{max}[S]}{\alpha K_M + \alpha'[S]}$	$\frac{1}{v_o} = \frac{\alpha K_M}{V_{max}}\frac{1}{[S]} + \frac{\alpha'}{V_{max}}$	V_{max}减小 K_M 增大或减小

[a] $\alpha = 1 + \frac{[I]}{K_I}$和 $\alpha' = 1 + \frac{[I]}{K'_I}$

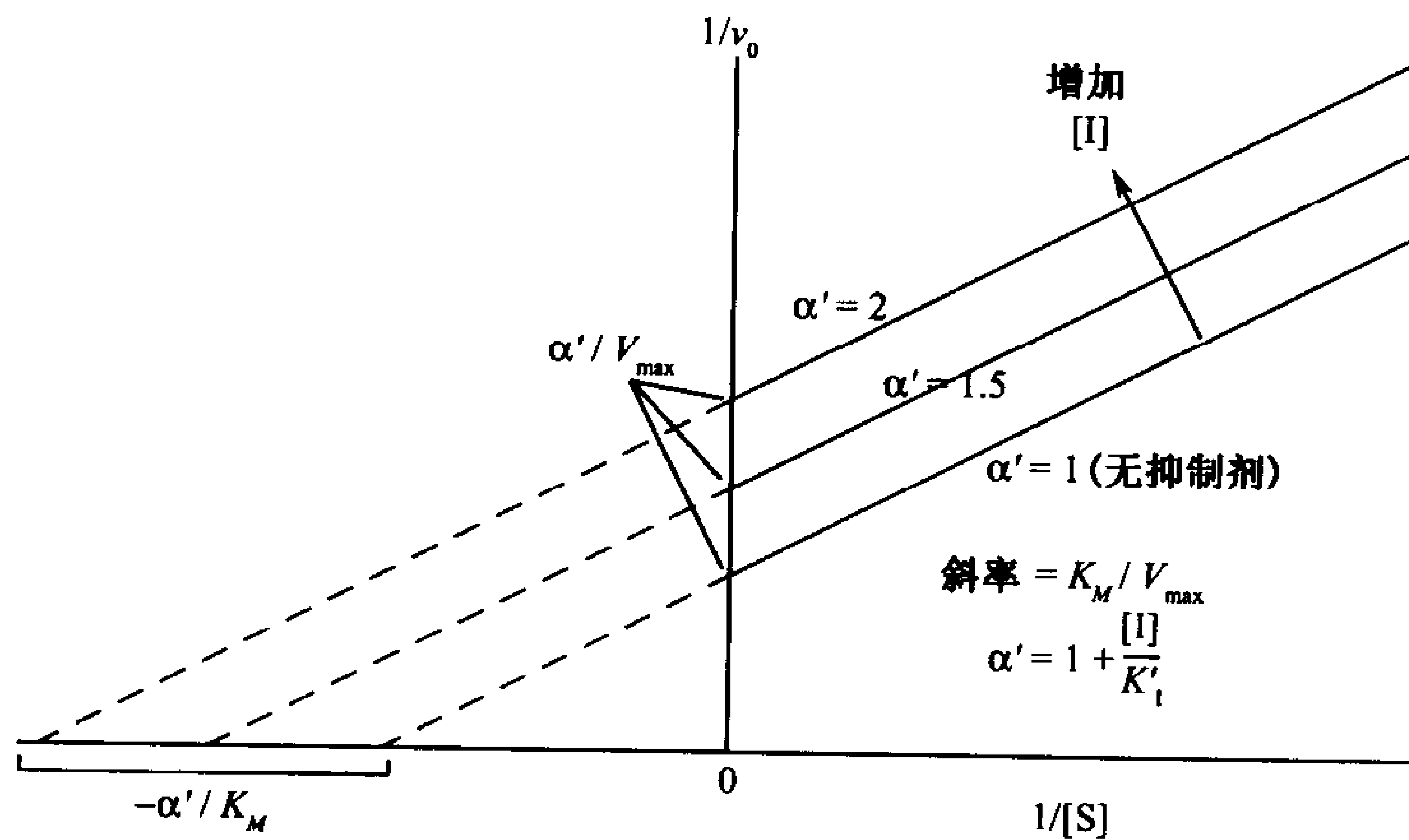


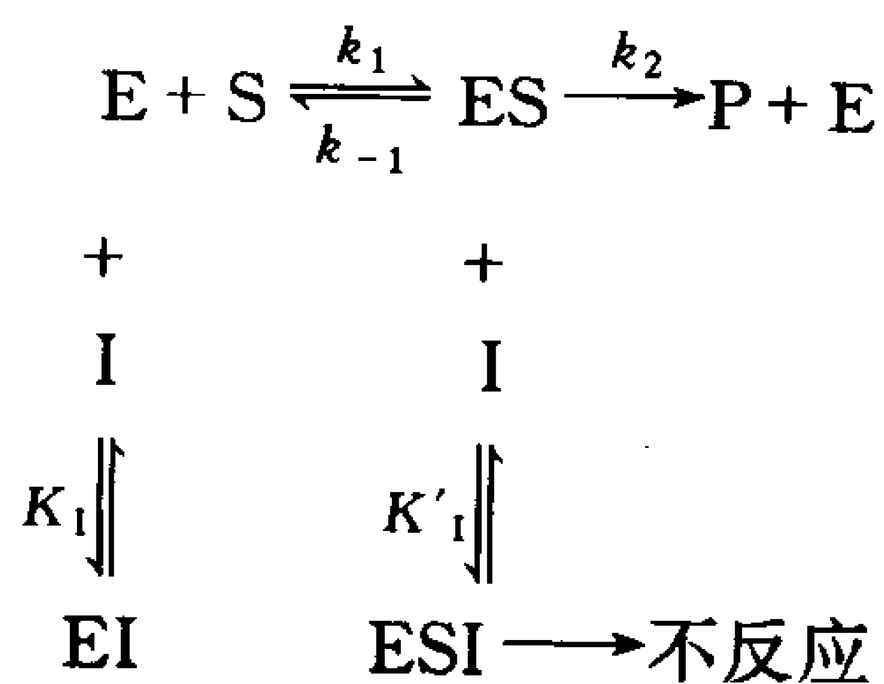
图 12-8 反竞争性抑制剂存在时 Michaelis-Menten 酶的Linewearer-Burk作图
注意所有的直线斜率都相同,均为 K_M/V_{max}。

反竞争性抑制作用要求抑制剂影响酶的催化功能,但不影响它和底物的结合。这对单底物酶是难以想象的,实际上,反竞争性抑制作用只对多底物酶有意义。

341

C. 混合型抑制

如果酶及酶-底物复合物都结合抑制剂,则产生如下模型:



这种现象称为**混合型抑制作用**(mixed inhibition)或称**非竞争性抑制作用**(noncompetitive inhibition)]。可能混合型抑制剂与酶的活性中心结合,此活性中心既参与和底物的结合又参与催化。抑制剂结合的两个解离常数不一定相等。

$$K_I = \frac{[E][I]}{[EI]} \qquad K'_I = \frac{[ES][I]}{[ESI]} \qquad [12\text{-}35]$$

混合型抑制作用的 Michaelis-Menten 方程和相应的双倒数方程列于表 12-2 中。和反竞争性抑制作用一样,K_M 和 V_{max}受抑制剂调节。混合型抑制作用这一名称起源于下述事实,即 Michaelis-Menten 方程的分母含有竞争性抑制作用中的 α 因子乘以 K_M 和反竞争性抑制作用中的 α'因子乘以[S]。

混合型抑制作用的双倒数作图由直线构成,其斜率为 $\alpha K_M/V_{max}$,在 $1/v_0$ 轴上的截矩为 α'/V_{max},在 1/[S]轴上的截矩为 $-\alpha'/\alpha K_M$(图 12-9)。不同[I]值的直线在 $1/v_0$ 轴左侧相交。在 $K_I = K'_I(\alpha = \alpha')$的特殊情况下,这个交点位于 1/[S]轴上(一个意义含混的命名,有时被称为非竞争性抑制的情形)。和反竞争性抑制作用一样,混合型抑制作用也是多底物酶动力学的一个重要特征。

342

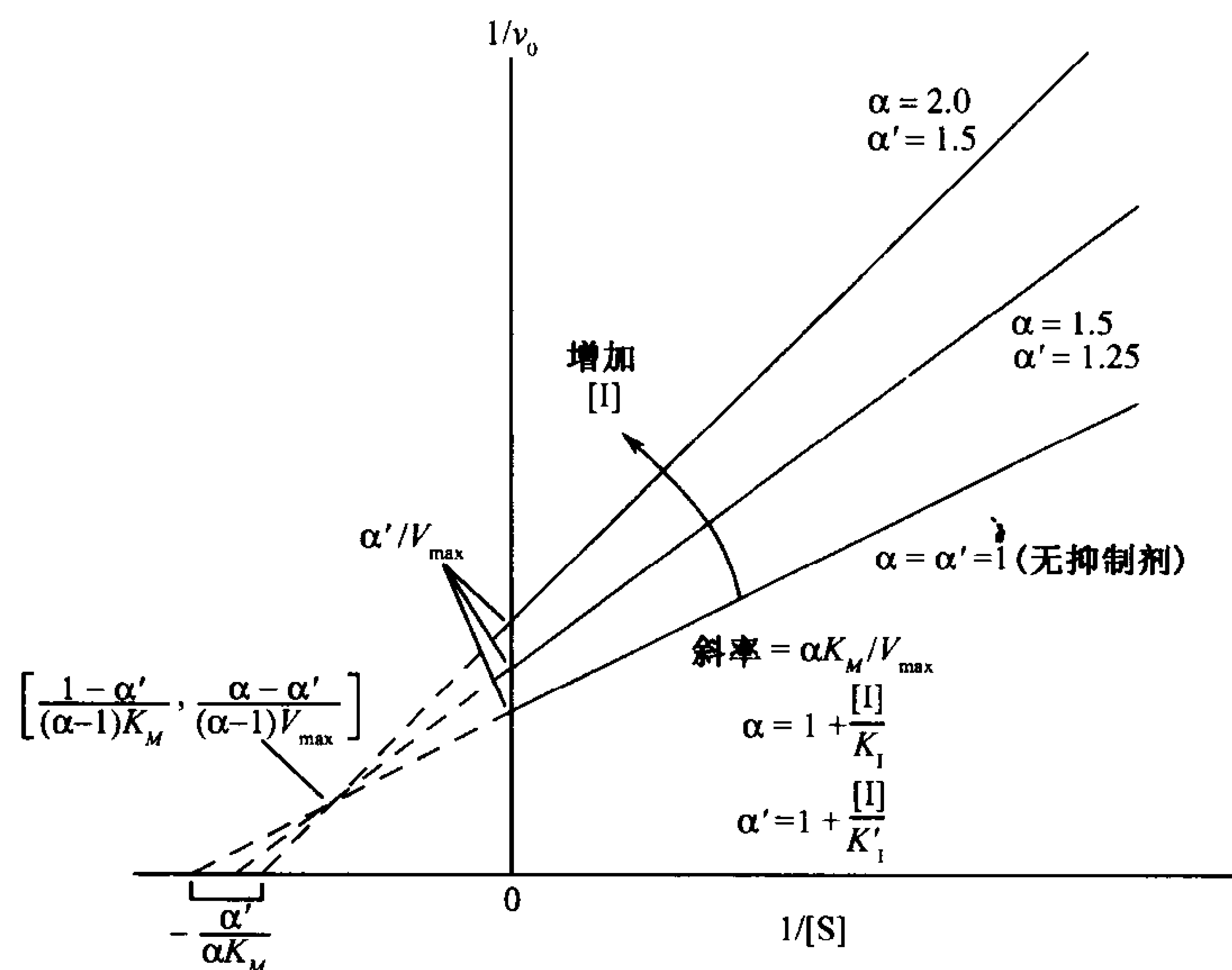


图 12-9　混合型抑制剂存在时 Michaelis-Menten 酶的 Linewearer-Burk 作图

注意,所有直线都交于 $1/v_0$ 轴左侧,交点的坐标在括号中给出。当 $K_I = K'_I$、$\alpha = \alpha'$时,直线交于 1/[S]轴上的 $-1/K_M$ 处。

不可逆失活类似非竞争性抑制作用

如果一种抑制剂与酶不可逆结合,则该抑制剂被归类为**失活剂**(inactivator)。失活剂确实在所有[S]值上降低有效的$[E]_T$(因而也降低 V_{max})水平,而不改变 K_M。所以,不可逆失活作用的双倒数作图与非竞争性抑制作用的作图相似(直线在 1/[S]轴上相交)。化学修饰特定氨基酸残基的试剂可作为失活剂,例如用于识别丝氨酸蛋白酶的催化残基 Ser 和 His(节 11-5A)的化合物都是这些酶的失活剂。

3. 酶活性的调节

机体必须能调节其组成酶的催化活性，才能协调其为数众多的代谢过程，以对环境的变化作出响应，并且生长和分化。这可通过两种途径实现：

343

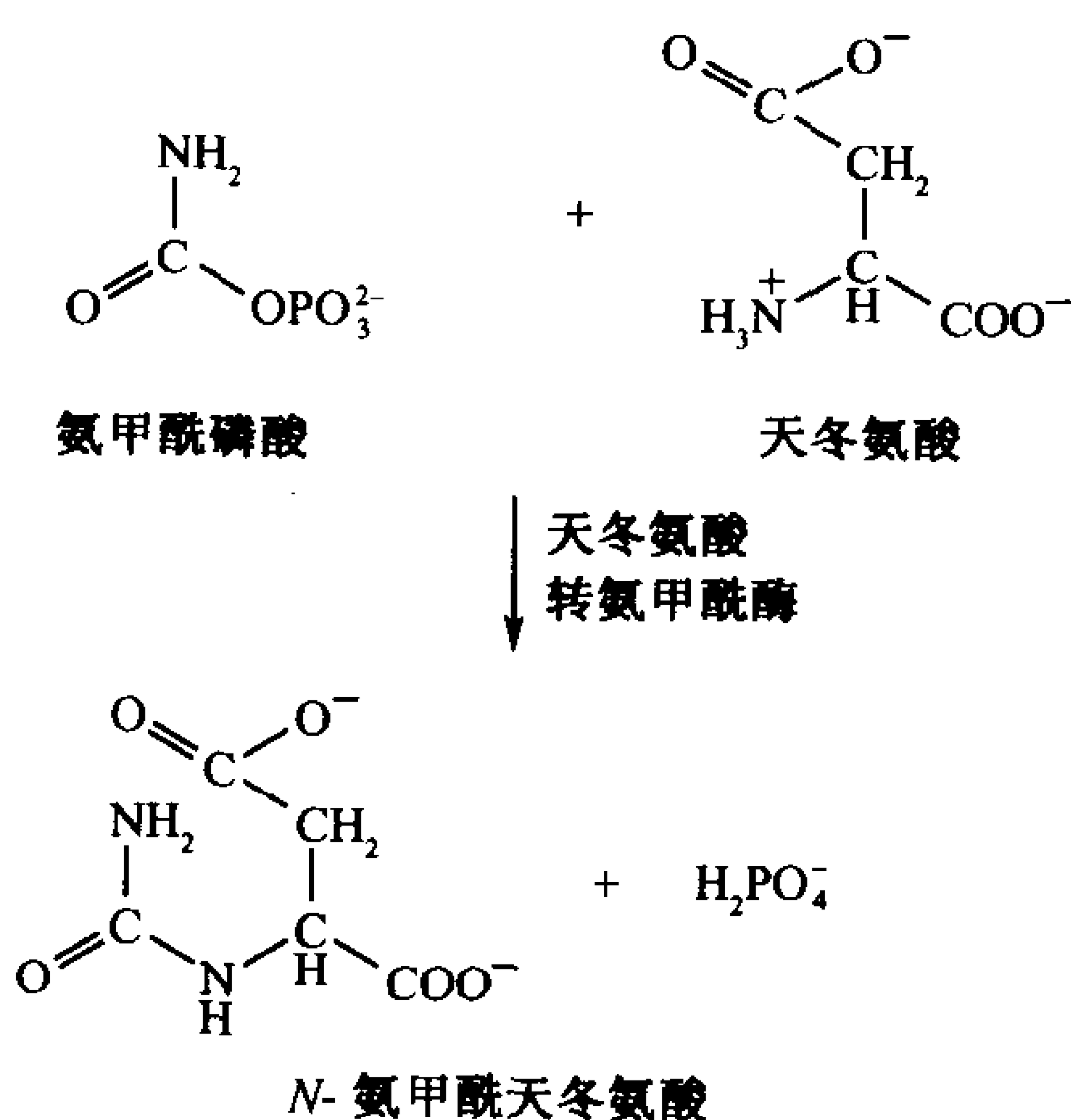
1）**控制酶的量**：细胞中特定酶的含量既取决于它的合成速率也取决于它的降解速率。每种速率都直接受控于细胞，并且在几分钟（细菌中）至数小时（高等生物）的时间段内有很大改变。

2）**控制酶活性**：酶的催化活性可通过结构改变影响酶对底物的结合亲和性，直接加以调控。正如血红蛋白的氧亲和性通过结合 O_2、CO_2、H^+ 和 BPG（节 7－2C）等配体来别构调节那样，酶对底物的结合亲和性同样可随小分子的结合而改变，这类小分子称为**别构效应物**（allosteric effector）。别构机制会引起酶活性较大的变化。有些酶的活性通过共价修饰来调节，通常为特定 Ser、Thr 或 Tyr 残基的磷酸化和去磷酸化。

在本节中，我们将通过一个例子——大肠杆菌（*E. coli*）中的**天冬氨酸转氨甲酰酶**（asparate transcarbamoylase, ATCase），来探讨酶活性的别构调节。我们还将在以后的章节中考察其他别构调节和共价修饰的例子。

ATCase 的反馈抑制调节嘧啶的合成

天冬氨酸转氨甲酰酶催化从**氨甲酰磷酸**（carbamoyl phosphate）和天冬氨酸至 ***N*-氨甲酰天冬氨酸**（*N*-carbamoyl aspartate）的合成：



这个反应是专门针对嘧啶生物合成的第一步（节 22-2A）。John Gerhart 和 Howard Schachman 研究了 *E. coli* ATCase 的别构行为，他们证实两个底物都协同性地与酶结合。不仅如此，ATCase 被嘧啶核苷酸——**胞苷三磷酸**（cytidine triphosphate, CTP）别构抑制，并被嘌呤核苷酸——**腺苷三磷酸**（ATP）别构活化。

ATCase 的 v_0 对[S]曲线是 S 形的（图 12-10），与遵从 Michaelis-Menten 模型的酶为双曲线不同，这符合协同性底物结合（回想一下，血红蛋白 O_2 结合曲线也是 S 形，图 7-7）。ATCase 的别构效应物将整个曲线右移或左移：在给定的底物浓度下，CTP 降低酶的催化速率，而 ATP 升高其速率。

CTP 是嘧啶生物合成途径中的产物，是一个**反馈抑制剂**（feedback inhibitor）的例子，因为它抑制其自身生物合成中一个早期步骤（图 12-11）。因而，当 CTP 水平高时，结合 ATCase，从而降低 CTP 的合成速率。反之，当细胞[CTP]降低时，CTP 从 ATCase 上解离，CTP 的合成加速。

344

ATP 激活 ATCase 有其代谢上的意义，这就是，它倾向于协调嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸的合成速率。在核酸的生物合成中，对这两种物质的需要量大致相等。例如，若 ATP 浓度远高于 CTP，则 ATCase 被激活，催化合成嘧啶核苷酸，直到二者浓度达到平衡。反之，若 CTP 浓度远大

于 ATP 浓度，CTP 抑制 ATCase，允许嘌呤核苷酸的生物合成，从而使 ATP 与 CTP 的浓度平衡。

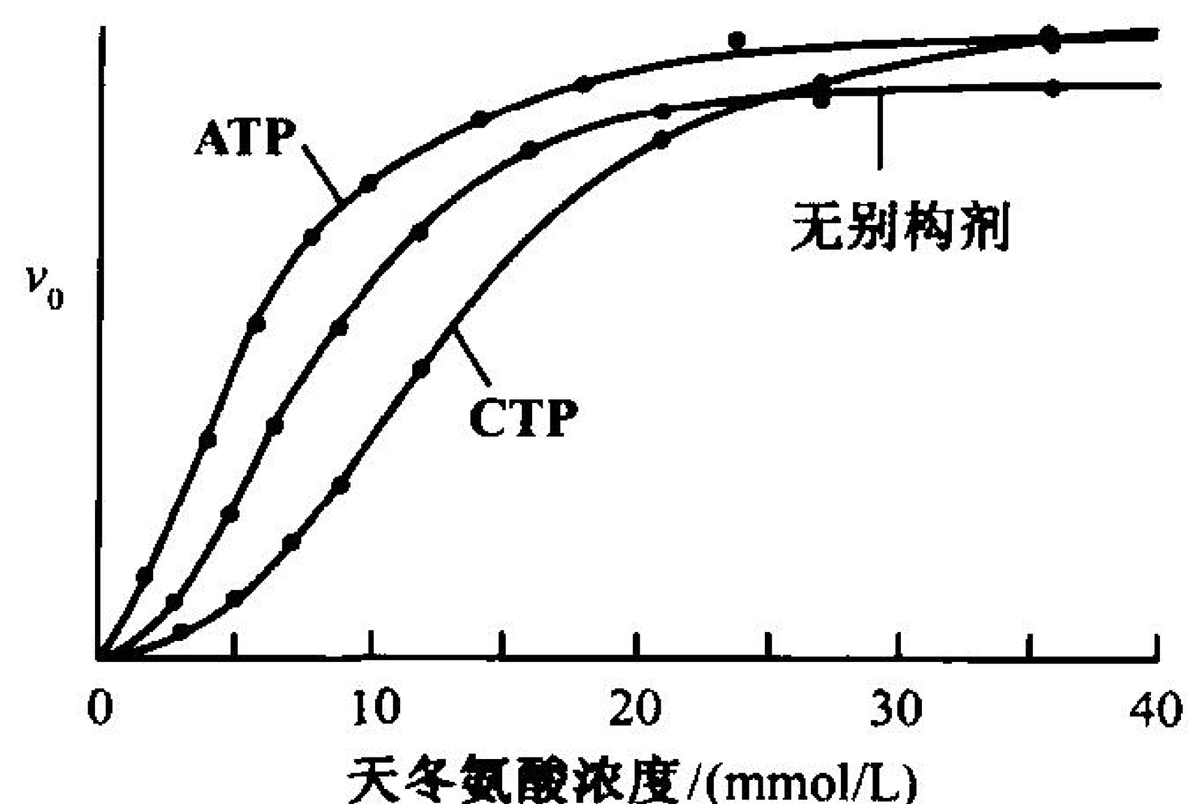


图 12-10 ATCase 反应的 v_0 对[天冬氨酸]作图

反应速度分别在无别构效应物、0.4mmol/L CTP（一种抑制剂）、20mmol/L ATP（一种活化剂）条件下测量。[引自 Kantrowitz, E. R., Pastra-Landis, S. C., Lipscomb, W. N, *Trends Biochem. Sci.* 5, 125(1980)]

别构效应改变 ATcase 的底物结合位点

E. coli ATCase（300kDa）的亚基组成为 c_6r_6，c 和 r 分别代表其催化亚基和调节亚基。William Lipscomb 测定的 ATCase 的 X 射线结构（图 12-12）表明，催化亚基排成两组三聚体（c_3），与三组调节亚基二聚体（r_2）组成复合物，每个调节二聚体连接两个不同的 c_3 三聚体中的催化亚基。

分离出来的催化三聚体具有催化活性，其催化速率的极大值比完整 ATCase 的更大，表现出非协同性（双曲线型）底物饱和曲线，并且不受 ATP 或 CTP 存在的影响。分离出来的调节二聚体可与别构效应物结合，但不具有酶活性。很明显，调节亚基别构性降低了完整酶中催化亚基的活性。

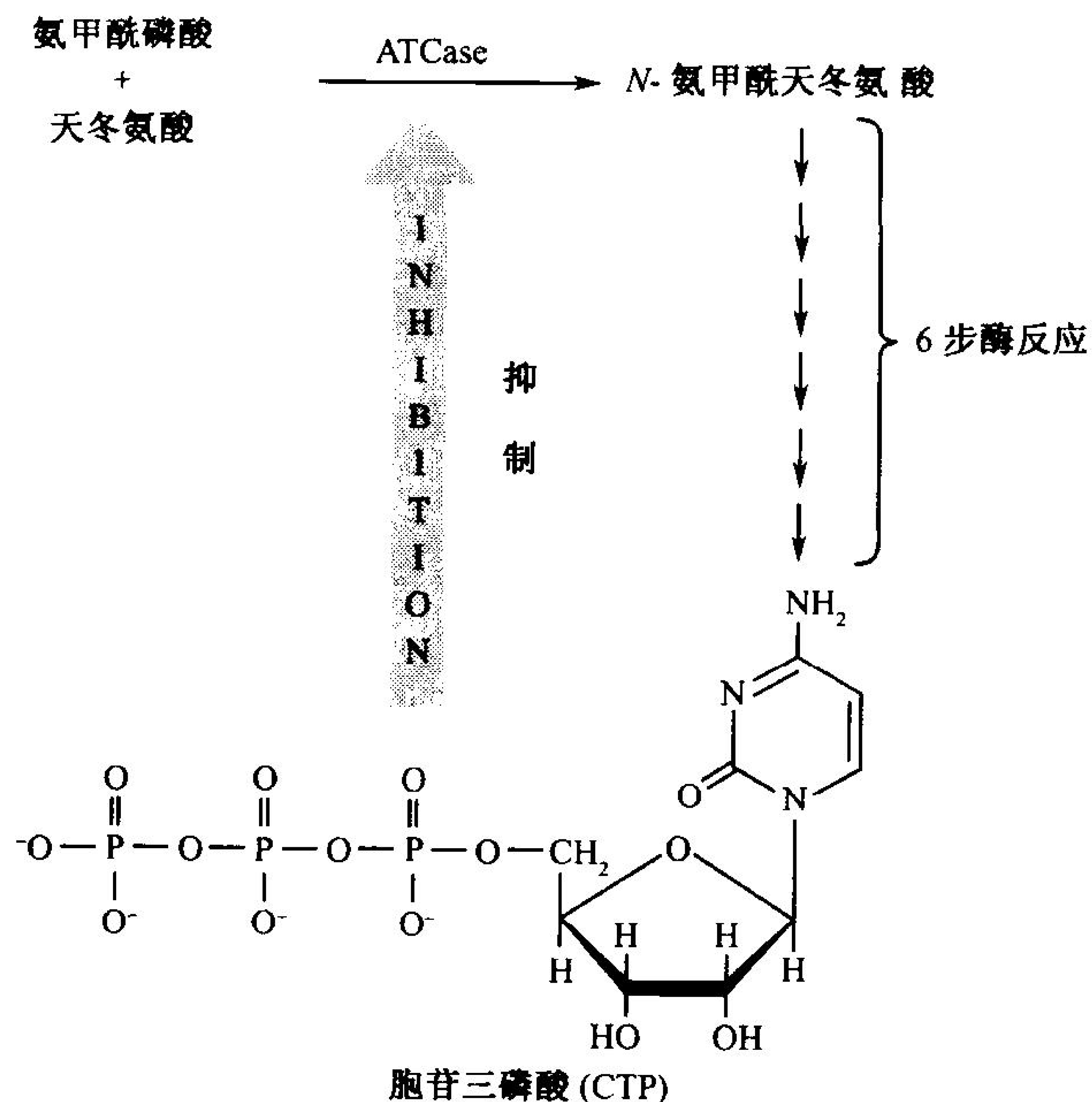


图 12-11 嘧啶生物合成途径的示意图

合成途径的终产物 CTP 抑制催化合成途径第一步的 ATCase。

正如别构理论预言的那样（节 7-2E），激活剂 ATP 优先结合到 ATCase 的活化态（R 态或称底物高亲和态），而抑制剂 CTP 优先结合到酶的非活化态（T 态或称底物低亲和态）。类似的，不反应的双底物类似物 **N-磷酸乙酰-L-天冬氨酸**（PALA）紧紧结合于 R 态 ATCase 但不与 T 态 ATCase 结合。

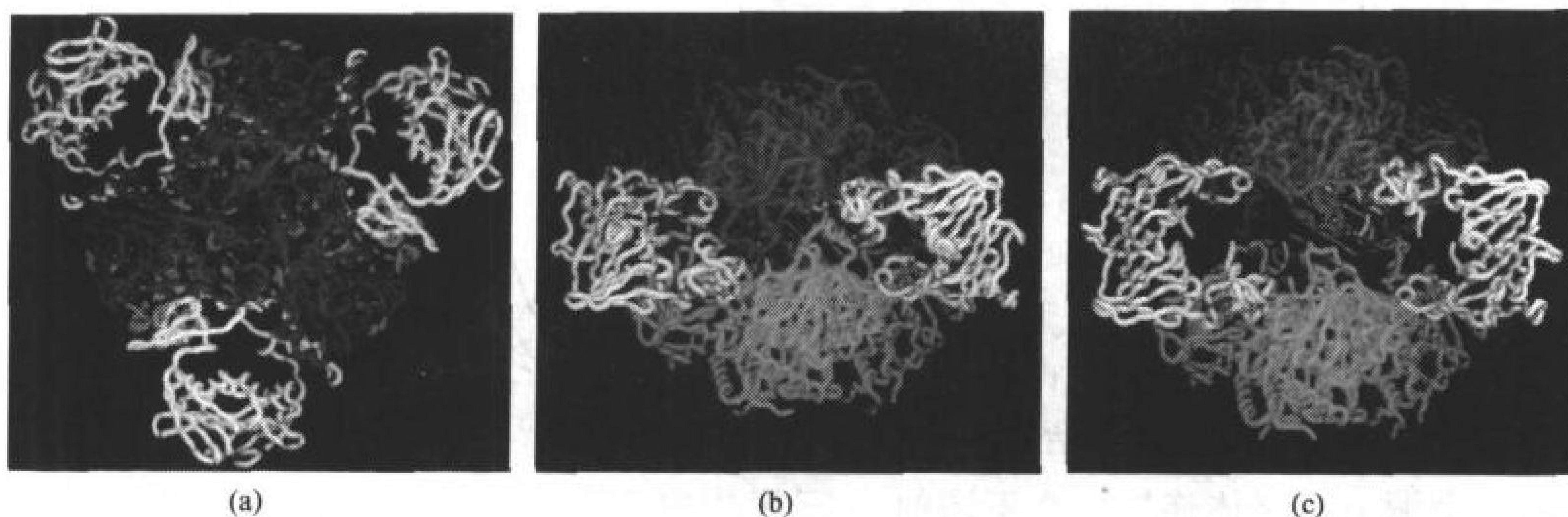
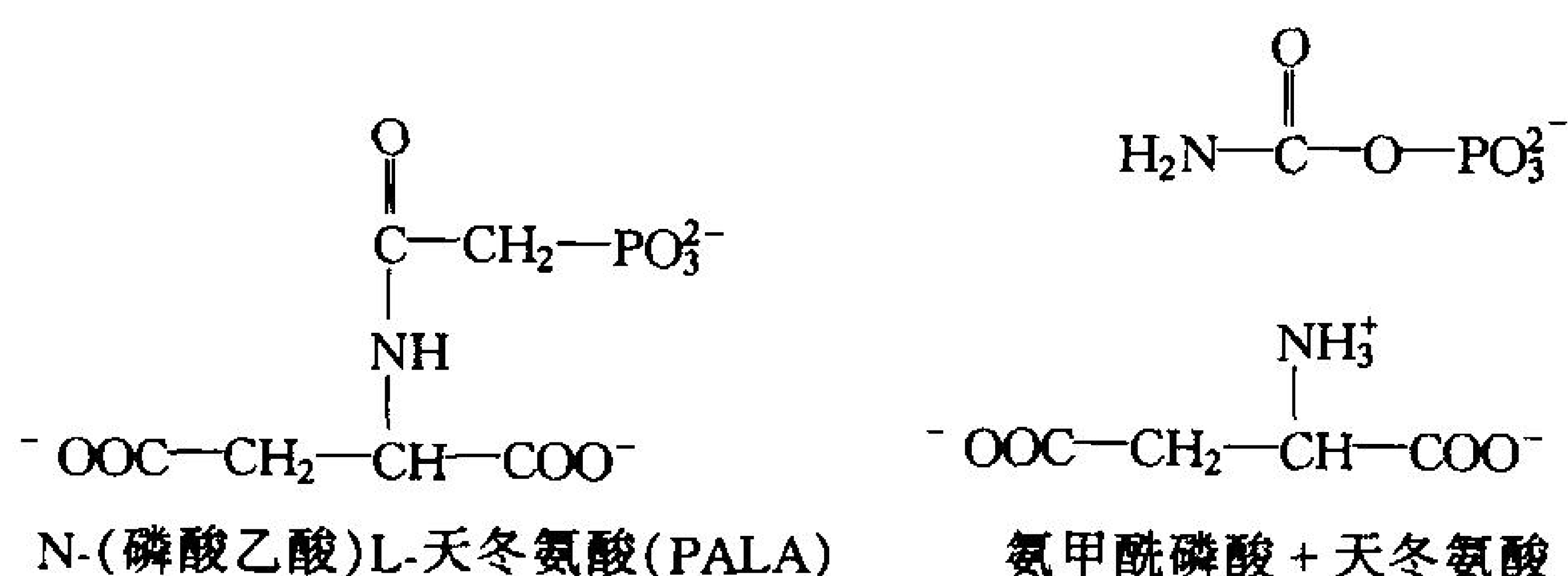


图 12-12 ATCase 的 X 射线结构

(a)T 态酶的多肽骨架，沿蛋白质分子的三重对称轴观察。(b)沿垂直于(a)的分子二重对称轴观察。调节二聚体(黄色)将上部的催化三聚体(红色)连接到下部的催化三聚体(蓝色)。(c)以(b)中视角看到的 R 态酶。注意：调节二聚体在 T→R(原文中错为 R→T)转变中的旋转是怎样导致催化三聚体沿三重轴分离的。(引自 Michael Pique, TheScripps Research Institute, La Jolla, Califormia)



T 态 ATCase-CTP 复合物和 R 态 ATCase-PALA 复合物的 X 射线结构已经测定(作为一条规则，不反应的底物类似物如 PALA，与酶形成的复合物比酶与快速反应底物的复合物更适合于结构分析；框 11-3)。结构研究表明，在 T→R 转变中，酶的催化三聚体沿分子三重轴分开约 11Å，并互相环绕该轴 12°重新定向(图 12-12b, c)。另外，调节二聚体环绕二重轴顺时针旋转 15°，并沿三重轴分开约 4Å。这样大的四级结构漂移使人联想起血红蛋白的情形(节 7-2c)。

ATCase 的每个催化亚基都由一个氨甲酰磷酸结合区域和一个天冬氨酸结合区域构成。PALA 与酶的结合，可能是模仿酶与这两个底物的结合，诱导了构象变化，使两个结构域转到一起，这样它们的两个已结合上去的底物就能够起反应，形成产物(图 12-13)。单催化亚基中的构象变化——有些残基高达 8Å 的移动——触发了 ATCase 的 T→R 四级结构漂移。ATCase 的三级结构漂移与四级结构漂移是密切相伴的(即 ATCase 严格遵从别构对称模型；节 7-2E)。因此底物与一个催化亚基的结合增强了另外五个催化亚基的底物结合亲和性，由此解释了酶的协同性底物结合。

346

ATCase 变构的结构基础

CTP 和 ATP 对 ATCase 活性效应的结构基础正被逐步揭示，抑制剂 CTP 和激活剂 ATP 都结合到调节亚基外边缘的同一位点上，离最近的催化位点约 60Å。CTP 优先结合 T 态，增加其稳定性，而 ATP 优先结合 R 态，增强其稳定性。

CTP 和 ATP 与其不太偏好的酶状态结合，也产生结构变化。当 CTP 结合在 R 态 ATCase 上时，在调节二聚体中诱导收缩，导致催化三聚体相互靠近 0.5Å(变得更像 T 态，即活性减小)，

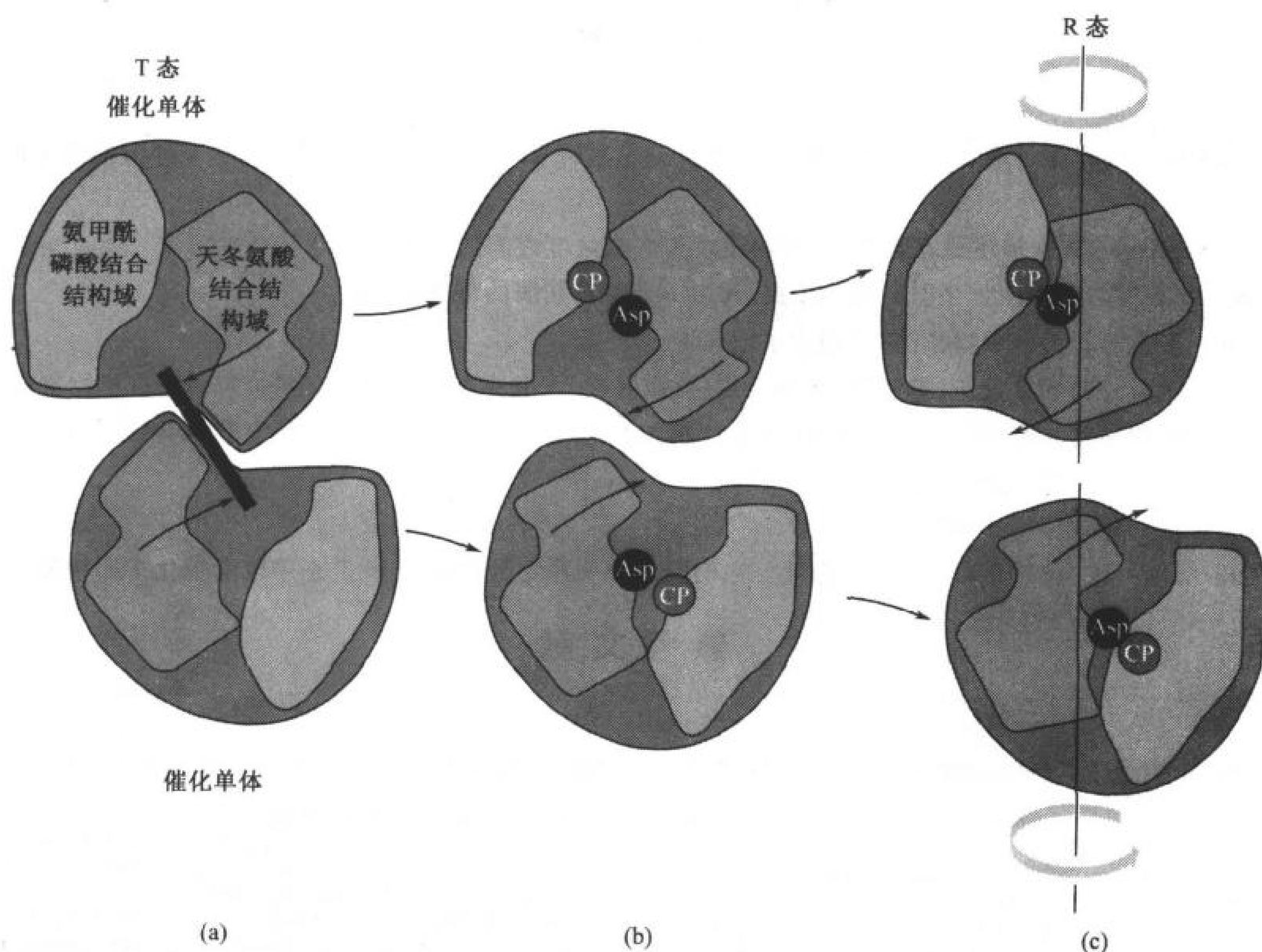


图 12-13 ATCase 中三级构象变化和四级构象变化的示意图

图中显示了 ATCase 6 个纵向作用催化亚基中的两个亚基。

(a)在没有结合底物的情况下，蛋白质保持在 T 态，因为将各亚基上两个结构域带到一起的运动（绿色箭头）被相互接触的天冬氨酸结合区域之间的立体干扰（黑色条带）阻碍。(b) 氨甲酰磷酸(CP)以及随后天冬氨酸(Asp)与其各自位点的结合，引起亚基分离并相对旋转，以允许 T→R 转变。(c)在 R 态，各亚基的两个结构域碰在一起，促使被缚底物形成产物的反应。（引自 Irving Geis）

反过来，又使酶活性位点的主要残基改变方向，从而降低酶的催化活性。ATP 结合在 T 态酶上时，本质上有相反的效应：它引起催化三聚体分开 0.4Å（变得更像 R 态，即活性增加），从而使酶活性位点上的主要残基改变方向，以增加酶催化活性。

其他酶中的别构转换类似血红蛋白和 ATCase

变构酶在自然界中广泛分布，趋向于占据代谢途径的主要调节位置。这类酶都是至少包含两个亚基的对称蛋白质。在所有已知的例子中，四级结构变化在酶的所有活性中心中起联系结合效应与催化效应的作用。四级结构漂移主要是亚基间的相对旋转。二级结构在 T→R 转换中大多保持不变，这一点可能对在几十 Å 距离外机械地传输变构效应具有重要性。

小　结

1. 基本化学反应可以是一级、二级或极少的为三级反应。在每一种情况下，速率方程将反应进程描述为时间的函数。
2. Michaelis-Menten 方程描述稳态条件下，初始速度与底物浓度之间的关系。
3. K_M 为反应速度达最大值一半时的底物浓度，K_{cat}/K_M 值表明酶的催化效率。
4. 以双倒数形式对动力学数据作图，可测定 K_M 和 V_{max}。
5. 双底物反应可分为顺序反应（单置换）和乒乓反应（双置换）。顺序反应可通过有序机制或随机机制进行。
6. 可逆性抑制剂通过与底物结合位点结合（竞争性抑制）、与酶-底物复合物结合（反竞争性抑制）、或两者都结合（混合抑制）而降低酶活性。
7. 酶活性可由别构效应物来调节。
8. ATCase 活性可被 ATP 升高、被 CTP 降低。它们通过分别稳定酶的 R 态和 T 态来改变催化中心构象。

参考文献

Cornish-Bowden, A., *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Butterworths (1979).

Evans, P.R., Structural aspects of allostery, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **1**, 773–779 (1991).

Fersht, A., *Enzyme Structure and Mechanism* (2nd ed.), Chapters 3–7, Freeman (1985).

Kantrowitz, E.R. and Lipscomb, W.N., *Escherichia coli* aspartate transcarbamoylase: the molecular basis for a concerted allosteric transition, *Trends Biochem. Sci.* **15**, 53–59 (1990).

Lipsky, J.J., Antiretroviral drugs for AIDS, *Lancet* **348**, 800–803 (1996).

Perutz, M., *Mechanisms of Cooperativity and Allosteric Regulation in Proteins*, Cambridge University Press (1990).

Schulz, A.R., *Enzyme Kinetics*, Cambridge University Press (1994).

Segel, I.H., *Enzyme Kinetics*, Wiley (1975).

Tinoco, I., Jr., Sauer, K., and Wang, J.C., *Physical Chemistry. Principles and Applications for Biological Sciences* (3rd ed.), Chapters 7 and 8, Prentice-Hall (1995).

Wood, W.B., Wilson, J.H., Benbow, R.M., and Hood, L.E., *Biochemistry. A Problems Approach* (2nd ed.), Chapter 8, Benjamin/Cummings (1981). [Contains instructive problems on enzyme kinetics with answers worked out in detail.]

关　键　词

基本反应　elementary reaction

k

v　反应速度

反应级数　reaction order

一级反应　first-order reaction

二级反应　second-order reaction

准一级反应　pseudo-first-order reaction

反应分子数　molecularity

速率方程　rate equation

$t_{1/2}$

复合物 ES　ES complex

k_{cat}/K_M

扩散控制极限　diffusion-controlled limit

Lineweaver-Burk（双倒数）图

顺序反应　Sequential reaction

有序机制　Ordered mechanism

随机机制　Randonm mechanism

乒乓反应　Ping Pong reaction

单置换反应　single-displacement reaction

双置换反应　double-displacement reaction

k_{-1}

k_2

稳态假设　steady state assumption

K_M

v_0　初速度

V_{max}　最大反应速度

酶饱和　Enzyme saturation

Michaelis-Menten 方程　Michaelis-Mentenet quation

Michaelis 复合物　Michaelis complex

k_{cat}

转化数　turnover number

抑制剂　inhibitor

失活剂　inactivator

竞争性抑制　competitive inhibition

K_I

反竞争性抑制　uncompetitive inhibition

混合抑制　mixed inhibition

别构效应物　allosteric effector

反馈抑制　feedback inhibition

学习思考题

1. 写出一级反应和二级反应的速率方程。
2. 酶反应的瞬时速度、初始速度和最大速度有什么区别?
3. 导出 Michaelis-Menten 方程。
4. 酶的 K_M 值和 k_{cat}/K_M 值揭示了什么?
5. 写出 Lineweaver-Burk(双倒数)方程并描述 Lineweaver-Burk 作图的特征。
6. 利用 Cleland 标记法描述有序顺序反应、随机顺序反应和乒乓反应。
7. 描述不同类型抑制剂对 K_M 和 V_{max}的效应。
8. 用什么来区别抑制剂和失活剂?
9. 列出一些调节酶活性的机制。
10. 解释 ATCase 的协同性底物结合和别构调节的结构基础。

练　习　题

1. 若 $t=0$ 时有 10μmol 放射性同位素^{32}P(半衰期 14 天),那么(a)7 天、(b)14 天、(c)21 天、(d)70 天时,还剩多少 ^{32}P?
2. 决定下列各反应是一级反应还是二级反应,并计算速率常数。

时间/s	反应 A 反应物/($mmol \cdot L^{-1}$)	反应 B 反应物/($mmol \cdot L^{-1}$)
0	6.2	5.4
1	3.1	4.6
2	2.1	3.9
3	1.6	3.2
4	1.3	2.7
5	1.1	2.3

3. 求 $v_0=0.95V_{max}$时,底物 S 的浓度(用 K_M 的倍数表示)。
4. 找出表 12-1 所列酶中,哪些酶的催化效率接近扩散控制极限。
5. 解释为什么下列来自 Lineweaver-Burk 图的各组数据单独使用对决定酶催化反应的 K_M 都不理想。

A组	$1/[S]/(mmol \cdot L^{-1})^{-1}$	$1/v_0/[(\mu mol \cdot L^{-1})^{-1} \cdot s]$
	0.5	2.4
	1.0	2.6
	1.5	2.9
	2.0	3.1

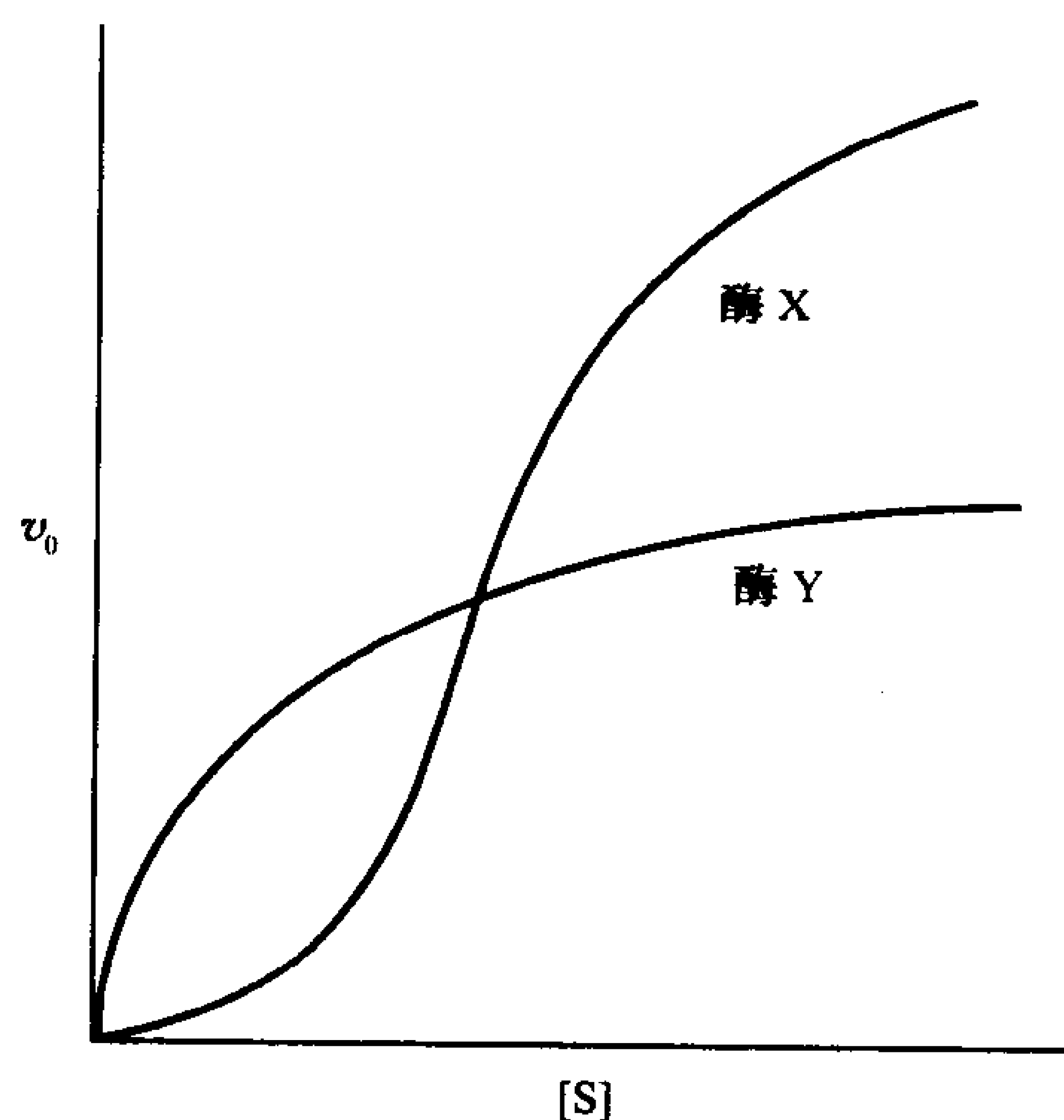
B组	$1/[S]/(mmol \cdot L^{-1})^{-1}$	$1/v_0/[(\mu mol \cdot L^{-1})^{-1} \cdot s]$
	8	5.9
	10	6.8
	12	7.8
	14	8.7

6. 由下列数据计算 K_M 和 V_{max}:

$[S]/(\mu mol \cdot L^{-1})$	$v_0/(\mu mol \cdot L^{-1} \cdot s^{-1})$
0.1	0.34
0.2	0.53
0.4	0.74
0.8	0.91
1.6	1.04

7. 在一个双底物反应中，第一个产物 P 仅少量被同位素标记(P^*)，将它加入到酶和第一个底物 A 中，不存在 B 或 Q。若反应遵从(a)乒乓机制；(b)顺序机制，则 A(＝P－X)会被同位素标记(A^*)吗？

8. 存在抑制剂和不存在抑制剂情况下，收集得到以下数据，确定酶反应的抑制类型。



[S]/(mmol·L^{-1})	v_0/(mmol·L^{-1}·min^{-1})	有 I 存在时的 v_0/(mmol·L^{-1}·min^{-1})
1	1.3	0.8
2	2.0	1.2
4	2.8	1.7
8	3.6	2.2
12	4.0	2.4

9. 当[I] = 5mmol/L 时，得到的 K_M 值是非抑制反应 K_M 的三倍，请估算该竞争性抑制剂的 K_I。
10. 酶 X 和酶 Y 催化同一反应，v_0 对[S]作图得到如下曲线。问哪一个酶在低[S]下效率更高？哪一个在高[S]下更有效率？
11. 最近发现鞘氨醇-1-磷酸(SPP)对细胞生存很重要。由鞘氨醇和 ATP 合成 SPP 被鞘氨醇激酶所催化。对鞘氨醇激酶反应动力学的理解可能对癌症治疗药物的开发具有重要作用。苏型鞘氨醇是鞘氨醇的立体异构体，在苏型鞘氨醇存在和不存在的条件下，测量鞘氨醇激酶反应速度，结果如下：

鞘氨醇浓度 /(μmol·L^{-1})	v_0/(mg·min^{-1}) (无抑制剂)	v_0/(mg·min^{-1}) (存在苏型鞘氨醇)
2.5	32.3	8.5
3.5	40	11.5
5	50.8	14.6
10	72	25.4
20	87.7	43.9
50	115.4	70.8

用 Lineweaver-Burk 作图来回答下列问题：

(a)在抑制剂存在和不存在的情况下，K_M 和 V_{max}分别是多少？

(b)苏型鞘氨醇是哪类抑制剂？给出解释。

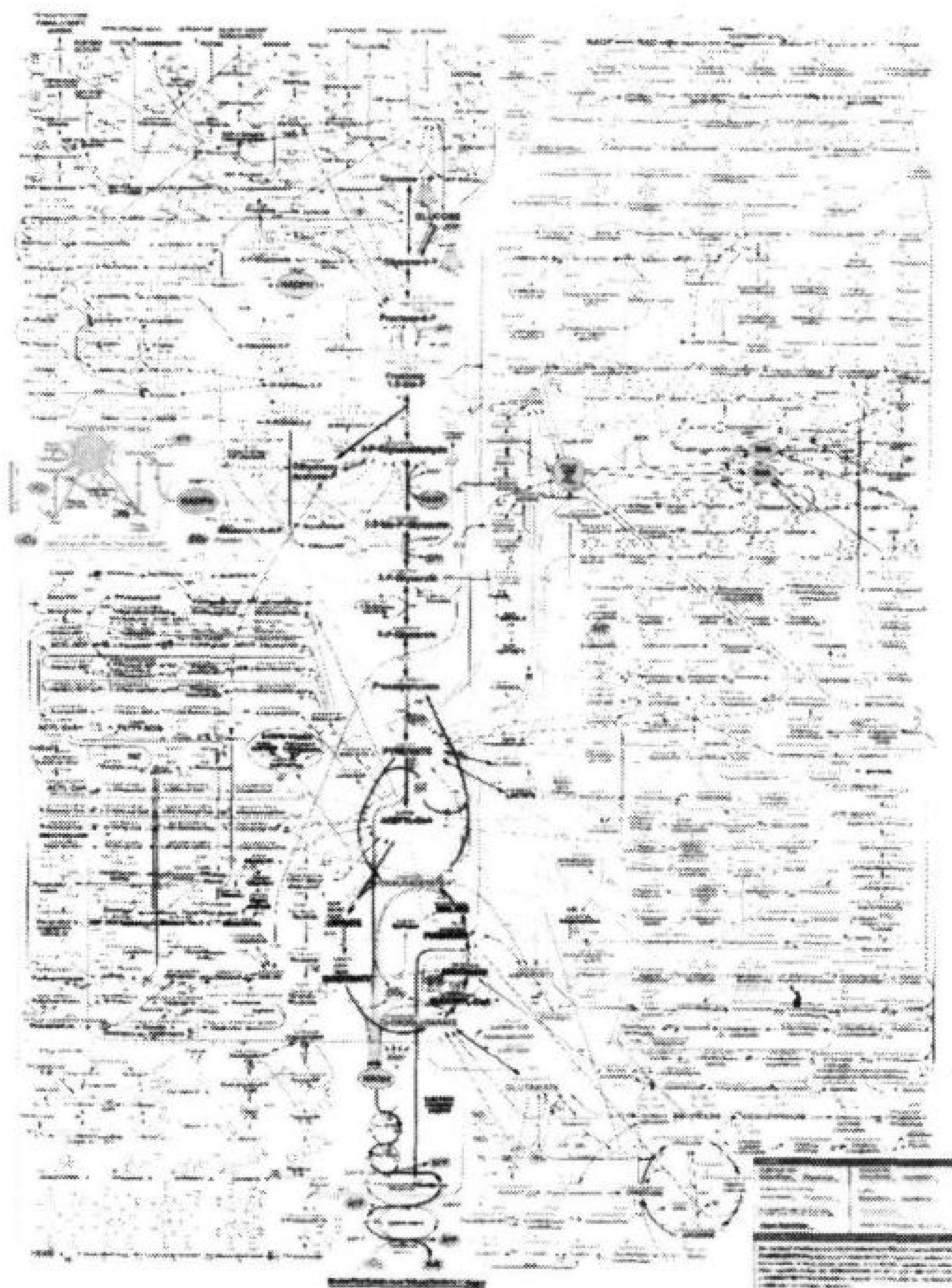
(习题由 Kathleen Cornely, Providence College 提供)

(南京大学　王　进　译)

第四篇　代　　谢

IV

第13章　代谢导论



生物分子分解和重新合成的过程形成了一个复杂而又高度调节的，以及相互依赖的酶反应网络，总称为生命。（图解由 Donald E. Nicholson 设计，Department of Biochemistry and Molecular Biology The University of Leeds, England-and Sigma）

354

了解生物分子的化学组分和三维结构对于了解它们如何组成有机体或者如何维持生命是不够的，因为我们必须考察生物分子构建和分解的反应，我们也必须考虑构建细胞物质和细胞做功时自由能是如何消耗的，以及自由能是如何从有机的或者其他的来源产生的。**代谢**(metabolism)是生命体系藉以获得并使用自由能来实施各种功能的全过程，习惯地分为两部分：

1) **分解代谢**(catabolism，异化作用)或称降解，即营养物或细胞组分被分解来补救它们的成分和(或)产生能量。

2) **合成代谢**(anabolism，同化作用)或称生物合成，即从简单的成分合成生物分子。

通常，分解代谢的反应是营养物分子的放能反应，由之释放的自由能用来驱动像合成代谢反应、机械做功及克服浓度梯度进行分子的主动运输等吸能过程。放能和吸能过程常常是通过中间物如 ATP 那样的“高能”化合物的合成来偶联的。基于许多化学反应的简单原理将在以后的章节叙述，在本章我们介绍代谢反应的概况以及 ATP 和作为能量载体的其他化合物的作用。我们也要考察研究生物动态代谢转化的一些方法。

1. 代谢概观

在任何活细胞中存在一系列令人困惑的化学反应，然而在所有的有机体中控制代谢的原理是相同的，它们有共同的进化起源，并受热力学定律的制约。事实上，代谢的许多特殊反应对所有有机体是相同的，其变化主要是由于支持这些反应的自由能的来源不同。

A. 营养策略

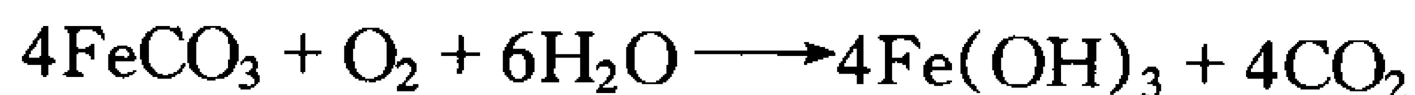
一个生物对营养的要求反应了代谢的自由能的来源。例如，有些原核生物是**自养生物**(autotroph)(希腊文的 auto 相当于英文的 self，而 tropho 相当于 feeder)，它们能从简单的分子如 H_2O、CO_2、NH_3 和 H_2S 合成其细胞的组分。对于这种过程有两个可能的自由能来源。**无机化能营养生物**(chemolithotroph，希腊文的 litho 相当于英文的 stone)是通过无机化合物如 NH_3、H_2S 或者甚至 Fe^{2+} 的氧化来获得其自由能：



$$2NH_3 + 4O_2 \longrightarrow 2HNO_3 + 2H_2O$$



$$H_2S + 2O_2 \longrightarrow H_2SO_4$$



$$4FeCO_3 + O_2 + 6H_2O \longrightarrow 4Fe(OH)_3 + 4CO_2$$

光能自养生物(photoautotroph)则通过光合作用为之，其过程是光能将无机供体的电子转移给 CO_2 产生碳水化合物$(CH_2O)_n$，然后碳水化合物被氧化而释放自由能。**异养生物**(heterotroph)(希腊文 hetero 即英文的 other)是通过氧化有机化合物(碳水化合物，脂类和蛋白质)获得自由能，因而最终依赖于自养生物提供这些物质。

按照分解营养物的氧化剂的性质将生物进一步分类。**专性需氧生物**(obligate aerobe)(包括动物)必须使用 O_2；而**厌氧生物**(anaerobe)使用硫酸盐或硝酸盐那样的氧化剂；**兼性厌氧生物**(facultative anaerobe)，例如大肠杆菌，在有氧或无氧时都能生长；相反地，对**专性厌氧生物**(obligate anaerobe)而言，氧的存在是有毒的，它们的代谢被认为与最早的生命形式相似，它发生在 35 亿多年前，当时地球的大气缺氧。我们对代谢的讨论多数将针对需氧的过程。

355

B. 代谢途径

代谢途径是产生特殊产物的一系列有关联的酶反应，它们的反应物、中间物以及产物称为**代谢物**(metabolite)。已知的代谢反应超过 2000 个，每一个反应被一特定的酶所催化。在一个给定的细胞中，酶及代谢物的类型随有机体的种类、细胞类型、它的营养状况及发育阶段而改变。许多代谢途径是分支的和互相关联的，所以从一个有成千个反应的网络中描绘一条途径是有些牵强的，并且受传统及化学逻辑所驱使(见框 13-1)。

通常分解代谢和合成代谢途径的联系如下(图 13-1)：在分解代谢途径中，复杂的代谢物分解成简单的产物并放出能量，在许多情况下，两个碳的乙酰单位与**辅酶 A**(coenzyme A)连接形成**乙酰辅酶 A(乙酰 CoA)**(节 13-2D)。这个降解过程释放的自由能通过从 ADP + P_i 合成 ATP 或将辅酶 $NADP^+$(图 3-4)还原成 NADPH 而保存起来，ATP 和 NADPH 是合成代谢反应的主要自由能源。下一章我们将密切地关注乙酰 CoA、ATP 和 NADPH 的热力学性质。

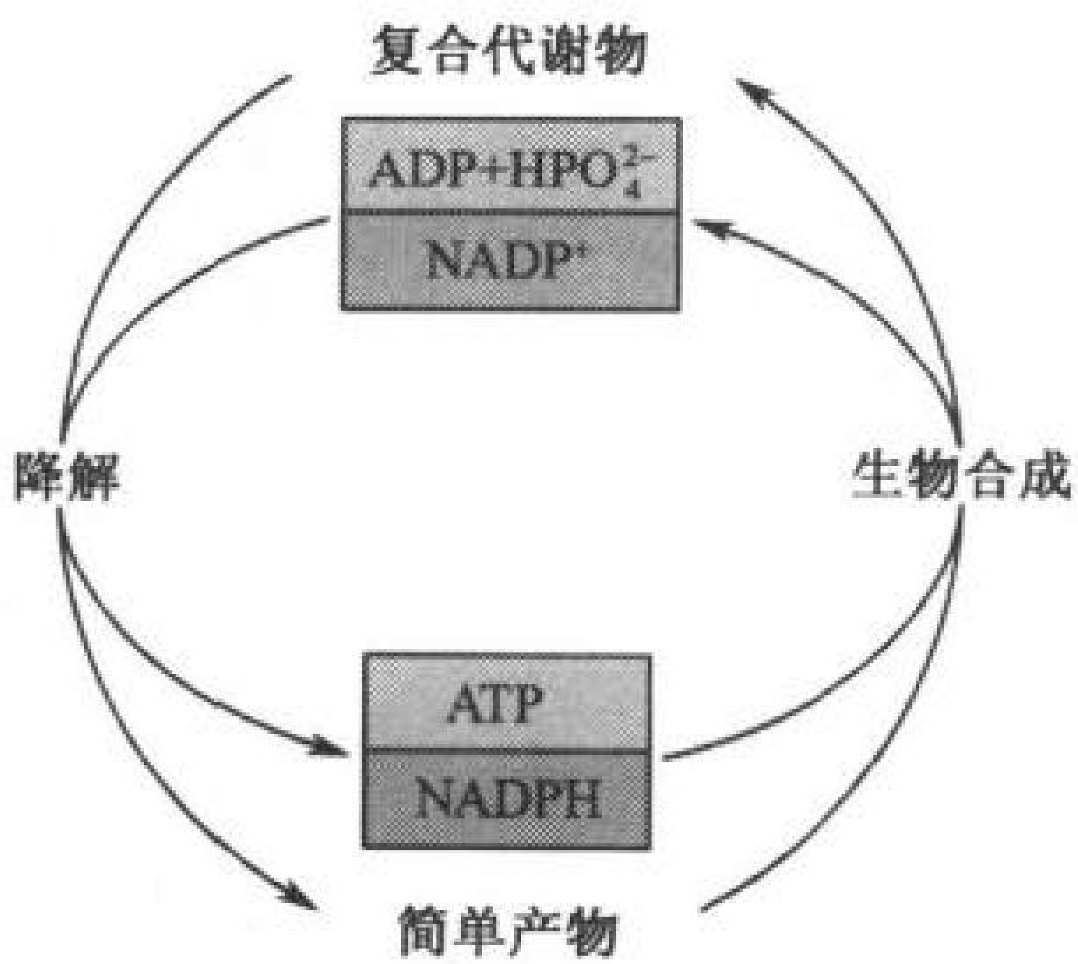


图 13-1　ATP 和 $NADP^+$ 在代谢中的作用
由降解复杂代谢物产生的 ATP 和 NADPH 是生物合成和其他反应的自由能的来源。

降解代谢的显著特点是：*大量不同物质(碳水化合物、脂类和蛋白质)的分解代谢途径集中于少数相同的中间物*。这些中间物在一个中心氧化途径中被进一步代谢。图 13-2 概要地列出各种养分分解成它们的单体再到乙酰-CoA 的过程，随后乙酰基的碳被**柠檬酸循环**(citric acid cycle)氧化成 CO_2(第 16 章)。这个过程中产生的还原型辅酶 NADH 和 $FADH_2$ 在**氧化磷酸化**(oxidative phosphorylation)过程中将它们的电子转给 O_2，产生 H_2O(第 17 章)。

生物合成途径进行相反的过程。*只有相对少数的代谢物作为大量产物的起始原料*。在以后几章我们将详细讨论许多分解代谢和合成代谢途径。

发生在特殊细胞部位的代谢途径

真核生物细胞质的分室作用使得不同的代谢途径在不同的部位进行，例如氧化碳酸化作用存在于线粒体，而**糖酵解**(glycolysis)(一条碳水化合物降解途径)和脂肪酸生物合成则在胞液中发生。表 13-1 列出真核生物细胞器的主要的代谢特征。对缺乏细胞器的原核生物而言，代谢过程可能定位于胞液的特殊区域。

356

表 13-1　真核细胞器的代谢功能

细胞器	功　能
线粒体	柠檬酸循环，氧化磷酸化作用，脂肪酸氧化，氨基酸分解
胞液	糖酵解，磷酸戊糖途径，脂肪酸生物合成，糖原异生作用的许多反应
溶酶体	细胞组分和摄食物质的酶消化
核	DNA 复制和转录，RNA 加工
高尔基体	膜和分泌蛋白翻译后的加工，质膜和分泌囊泡的形成
粗糙内质网	合成与膜结合的蛋白和分泌蛋白
平滑内质网	脂类和甾类化合物的生物合成
过氧化物酶体(植物中为乙醛酸循环体)	被氨基酸氧化酶和过氧化氢酶催化的氧化反应，植物中的乙醛酸循环的反应

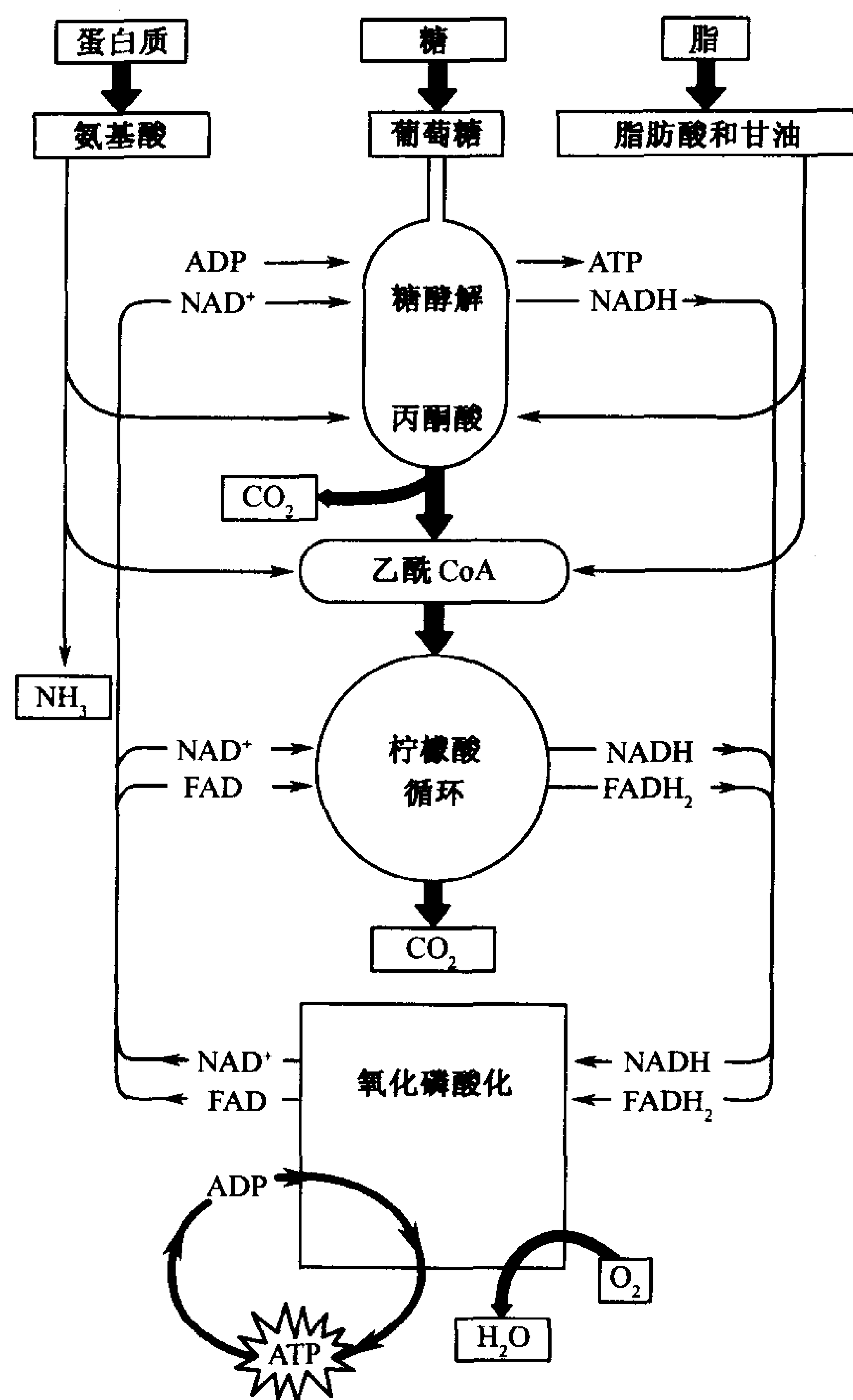


图 13-2 代谢的秘诀:异化作用概观

复杂的代谢物如糖、蛋白质和脂类,首先降解成其单体,主要是葡萄糖、氨基酸、脂肪酸和甘油,然后降解成共同的中间物乙酰 CoA。乙酰基通过柠檬酸循环氧化成 CO_2,同时还原 NAD^+ 和 FAD,而 NADH 和 $FADH_2$ 则通过氧化磷酸化作用被氧重新氧化产生水和 ATP。

真核细胞里有些代谢物在与膜结合的特殊分室中合成,这就要求有在分室之间转运这些物质的机制。因此,转运蛋白(节 10-4)是许多代谢过程的基本组分,例如将线粒体产生的 ATP 转运到胞液中就要求一种转运蛋白,大部分 ATP 在胞液中被消耗掉。

对于多细胞生物,分室作用提高到组织和器官的水平。例如哺乳动物的肝主要负责从非碳水化合物的前体合成葡萄糖[**糖异生作用**(gluconeogenesis)](节 15-4),以维持循环中相对恒定的葡萄糖水平,而脂肪组织却专门贮存三酰甘油酯。各种器官中代谢功能的相互依赖是第 11 章要叙述的主题。

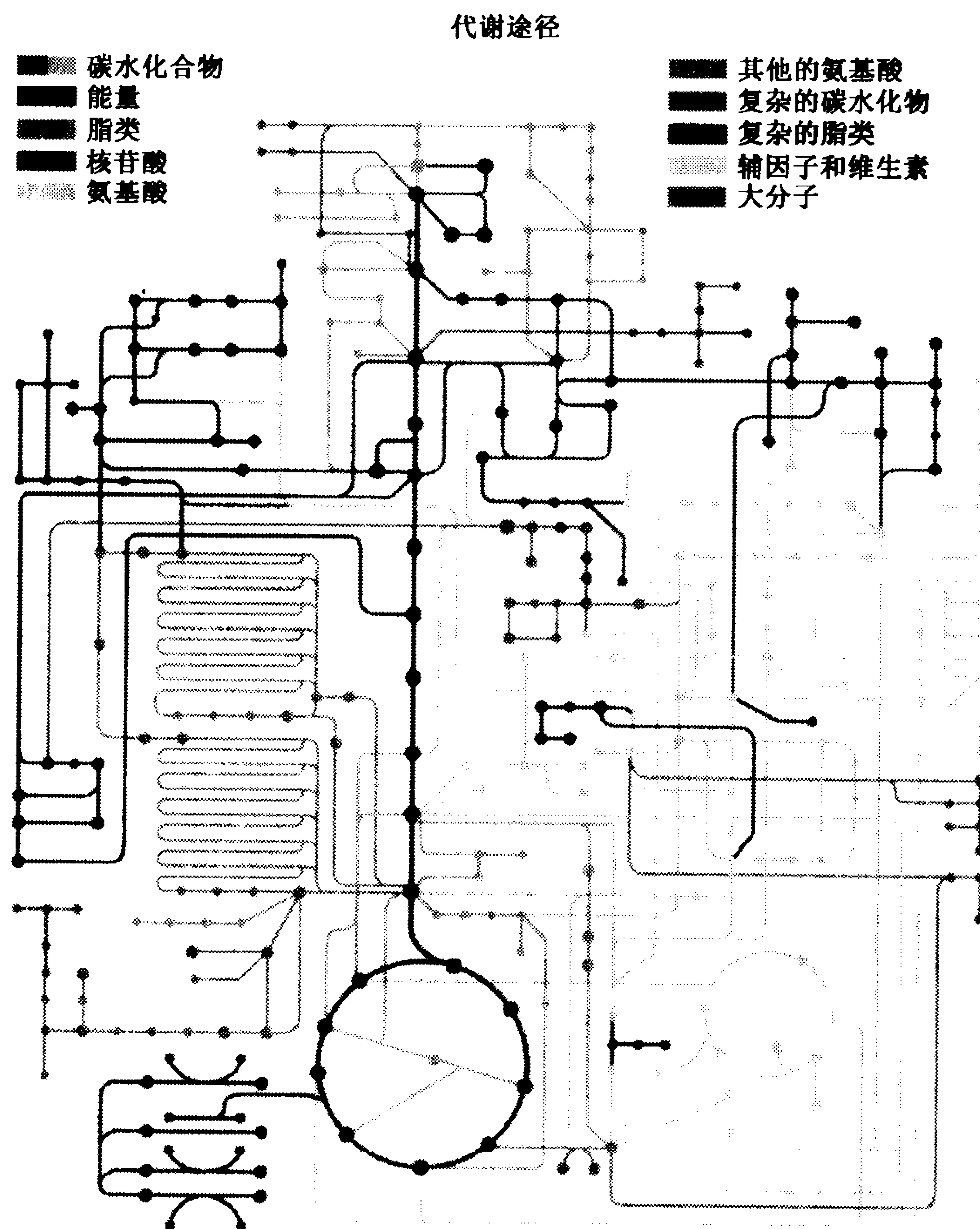
357

框 13-1　生物化学焦点

编制代谢途径

将存在于一给定有机体中的所有的酶反应编成目录的任务是艰巨的,并且在几乎所有的情况下是不完全的。然而,构成主要的分解和合成途径的代谢反应能编制成一张图,下图就是这样的代谢图,以颜色代表代谢物的类型。图中每个点代表一个代谢物,而点间的线相当于代谢物相互转变的酶反应。代谢途径的高度分支和相互联系的性质是很明显的。同样也存在环状途径。并非所有描绘于此的反应存在于一切有机体中,而且还有数不清的酶反应没有普遍到值得画入这张"通用"图中。

因特网存取的数据库将代谢的酶(以 EC 数识别,节 11-1A)与不同有机体中相应的基因序列以及已知的蛋白质的三维结构连接起来,如此连接的数据库对于追寻不断增多的大量与蛋白质及其代谢功能有关的资料是很重要的。催化相关反应的酶的序列和结构的同源现象也使得更易于推断蛋白质可能的代谢功能,而编码这些蛋白质的基因是通过基因组测序发现的(节 3-4C)。像这里刊出的这个图一样,图解可能有助于将新发现的酶反应汇编入相关连的代谢途径中。

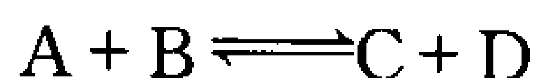


[引自 the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (www.genome.ad.jp/kegg/)]

在组织和亚细胞分室中有一个有趣的特殊现象，即存在**同工酶**(isozyme)，它催化相同的反应，但被不同的基因编码，并有不同的动力学或调节性质，例如脊椎动物的**乳酸脱氢酶**(lactate dehydrogenase, LDH)有两个同系物：M型主要在倾向于厌氧条件组织中，例如骨骼肌和肝；而H型主要在好氧的组织如心肌中。乳酸脱氢酶催化**丙酮酸**(pyruvate)(糖酵解的一个产物)与**乳酸**(lactate)的相互转变(节 14-3A)。M型同工酶的功能主要表现在由 NADH 将丙酮酸还原成乳酸，而H型的酶更适合于催化逆向的反应。同工酶的存在可用来测定各种疾病，例如心脏突然发病使心肌细胞死亡，细胞会破裂并释放H型 LDH 到血液中，因此，血液化验出存在H型 LDH 可诊断心脏突然发病。

C. 热力学考虑

回顾节 1-4D 一个生物过程的自由能变化(ΔG)，如下反应



$$A + B \rightleftharpoons C + D$$

是与标准自由能变化 $\Delta G^{\circ\prime}$ 以及反应物的浓度有关的(方程 1-15)：

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + RT\ln\left(\frac{[C][D]}{[A][B]}\right) \qquad [13\text{-}1]$$

然而，当反应物的值接近其平衡值时，$[C][D]/[A][B] \approx K_{eq}$，并且 $\Delta G \approx 0$。许多代谢反应的情况就是如此，称之为**近平衡反应**(near-equilibrium reaction)。由于它们的 ΔG 值近于 0，这些反应能通过改变产物与反应物的比例相当容易地逆转。当反应物超过其平衡浓度时，净反应向前进行直到过量的反应物转变成产物并达到平衡。相反地，当产物过量时，净反应朝逆向进行，转变产物成反应物直到再一次达到平衡的浓度比。*催化近平衡反应的酶倾向于快速作用以恢复平衡浓度，这些反应的净速度能被反应物和产物的相对浓度有效地调节。*

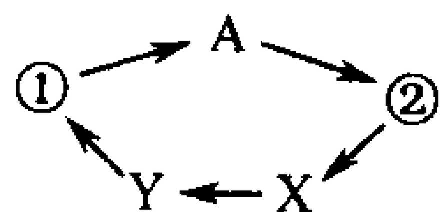
358

其他的代谢反应远离平衡，这就是说，它们是不可逆的。这是因为催化这种反应的酶的活力不足以使其达到平衡。因此反应物积累大大超过它们平衡时的量，使得 $\Delta G \ll 0$。所以反应物浓度的改变对不可逆反应速度的影响相对要小，酶基本上是饱和的。只有通过变构作用改变酶的活性才能显著改变反应速度。因此，酶类似于河上的坝：*酶通过改变其活性来控制底物的流动，就像一座坝通过改变其闸门的开启来控制河水的流动。*

要了解代谢物通过代谢途径的**通量**(flux)(流速)，就需要了解哪些反应是近平衡的，哪些又是远离平衡的。在一条代谢途径中，多数酶催化近平衡反应，因而其净速度随底物浓度而变。然而代谢途径中某些酶催化远离平衡的反应在战略上很重要，它有几种重要的含义：

1) **代谢途径是不可逆的**。高度放能的反应($\Delta G \ll 0$)是不可逆的，也就是说能反应完全。假如这一反应是多步途径的一部分，它则决定该途径的方向，亦即它使整个途径不可逆。

2) **每个代谢途径有一个第一关键步骤**。虽然一条代谢途径的多数反应是接近于平衡的，但通常在途径的前期有一不可逆的放能反应，以“约束”它的产物继续通过该途径(就像流过水坝的水不能返回)。



3) **分解代谢和合成代谢的途径是不同的**。如果一个代谢物通过放能过程转变成另一代谢物，要使第二个反应物转回第一反应物必须提供自由能。这一能量的“上坡”过程需要一个不同的途径，至少数步反应。正如我们将要看到的，存在独立的相互转化的路线是代谢途径的一个重要特性，因为这样可以独立控制两个过程。假如细胞需要代谢物 2，就必须

"关闭"从 2 到 1 的途径而"打开"从 1 到 2 的途径。如果没有不同的途径,这样独立的控制是不可能的。

359

D. 代谢通量的控制

活的有机体是热力学开放系统,倾向于保持稳定状态而不是达到平衡(节 1-4E)。下列观察有效地阐明:40 年的时间内一个普通的成年人消耗以吨计的营养物并饮掉 20 000 升以上的水,尽管如此,体重仍没有显著的改变。*在稳定状态,中间物通过一条代谢途径的通量或多或少是恒定的,也就是说,每条途径合成和分解中间物的速率使中间物保持恒定的浓度。*一个远离平衡的稳定状态在热力学上是有效的,因为只有非平衡过程($\Delta G \neq 0$)才能做有用功。的确,活系统如果达到平衡就是死亡。

因为代谢途径是一系列的酶催化的反应,这就最容易通过单独考虑反应步骤来描述中间物通过该途径的通量。代谢物通过每步反应的通量 J 是正向反应的速率 v_f 减去逆向反应的速率 v_r:

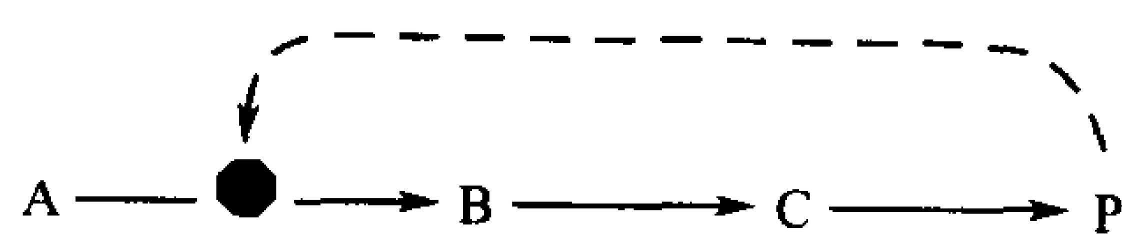
$$J = v_f - v_r \qquad [13\text{-}2]$$

根据定义,平衡时虽然 v_f 和 v_r 可能十分大,但没有净通量($J = 0$)。对于远离平衡的反应,$v_f \gg v_r$,所以通量基本上等于正向反应的速率($J \approx v_f$)。*通过稳态途径的通量是不变的,并被该途径的限速步骤所决定。*很明显,通过限速反应的通量按生物代谢的需要而改变,以便到达一个新的稳定状态,并且通量的这种变化必须传遍整个途径。

按照定义,一条途径的限速反应(它常常是第一关键反应)是其最慢的反应。因此限速反应的产物在它能与反应物建立平衡之前被途径中的后继途径移去,所以*限速反应的作用是远离平衡的,并且有一个大的负自由能变化。*与之类似,水坝造成上游和下游河岸之间的水位差,而一个大的负自由能变化是由流体静力学的压差产生的。水坝能放水发电,按所需电力改变水流。

一个非平衡反应的速率对其反应物浓度的变化是相当不灵敏的,这就可以确立代谢物通过代谢途径的稳态通量。因此改变那个反应的速率就会改变反应物通过整个途径的通量,常常达一个数量级或更多。有些机制可以控制通过限速反应的通量:

1) **变构控制**(allosteric control)。许多酶被效应物变构调节(节 12-3),这些效应物常常是底物、产物或代谢途径的辅酶,但未必作用于正在讨论的酶。例如负反馈调节中,代谢途径的产物抑制该途径前面的一步反应:



因此,正如我们所看到的,嘧啶生物合成的一个产物 CTP 抑制该途径中催化限速反应的 ATC 酶(图 12-11)。

360

2) **共价修饰**(covalent modification)(**酶的互变**)。控制代谢途径通量的许多酶有特异性位点,这些位点可进行酶的磷酸化与脱磷酸化作用,或者以某些其他方式作共价修饰。(见下页图 1)这些本身受到控制的酶的修饰过程大大改变了被修饰的酶的活性。在节 14-4B 将讨论这种通量控制机制。

3) **底物循环**(substrate cycle)。假如 v_f 和 v_r 代表被不同酶催化的两个方向相反的非平衡反应的速率,则 v_f 和 v_r 可以独立地改变(见下页图 2)。例如,通量($v_f - v_r$)的增加不仅能通过加速正向反应也可借助减缓逆向反应来达到。正如我们将在节 14-4 中看到的,通过这种**底物循环**的通量比通过简单的不对立的非平衡反应的通量对变构效应物的浓度

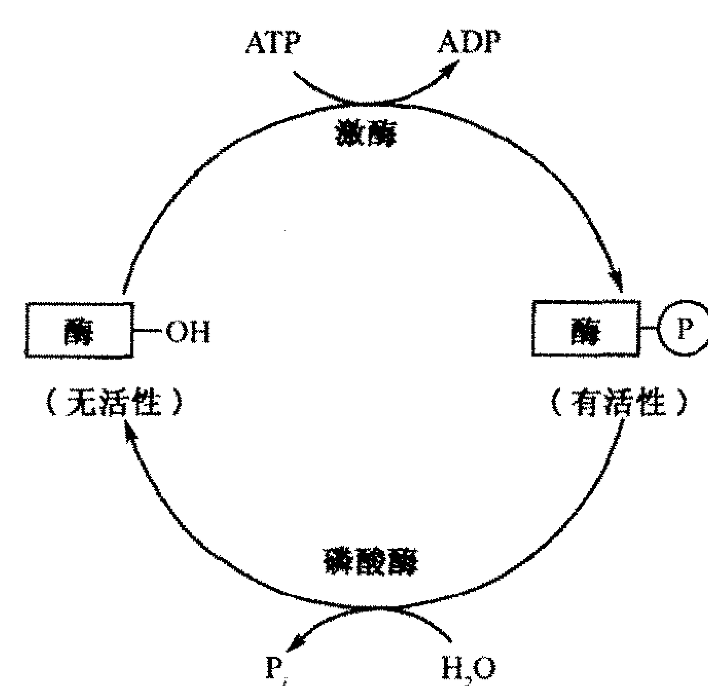


图 1

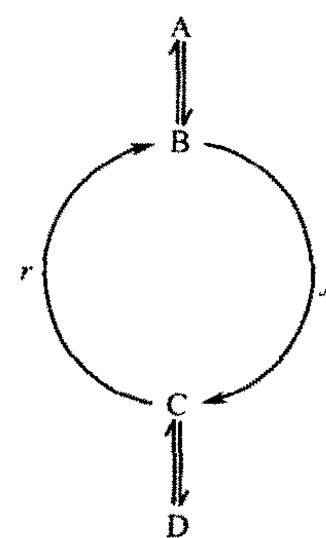


图 2

更灵敏。

4) **遗传控制**(genetic control)。酶浓度以致酶活性能按代谢需要由蛋白质的合成来改变。遗传控制酶浓度是本书第五部分的一个主要内容。

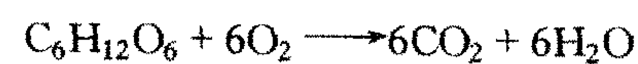
机制 1 到 3 能快速地(数秒或数分钟内)对外部刺激作出回应,因而归于"短期"控制机制,机制 4 对条件改变的回应慢得多(高等动物数小时或数天内),因而称作"长期"控制机制。

近平衡反应对底物浓度的改变迅速地作出回应。因此,一系列近平衡反应从限速那步以后全都有相同的通量。然而多数代谢途径的控制是由数个非平衡步骤分担,所以物质通过一条途径的通量可能依赖于多种效应物,其相当的重要性反映了该有机体在给定时间内全部的代谢需要。

361

2."高能"化合物

像葡萄糖那样的代谢燃料完全氧化时



$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

释放相当多的能量($\Delta G^{\circ\prime} = -2850\ kJ \cdot mol^{-1}$)。一个典型的脂肪酸棕榈酸的完全氧化 $C_{16}H_{32}O_2 + 23O_2 \longrightarrow 16CO_2 + 16H_2O$ 甚至放能更多($\Delta G^{\circ\prime} = -9781\ kJ \cdot mol^{-1}$)。氧化代谢是逐步进行的,所以在总过程中的每个放能步骤释放的自由能能以易使用的形式贮存起来。这些能量"包裹"是通过合成几类**"高能"中间物**("high-energy" intermediate)保存起来,它们随后的放能分解驱动吸能过程。因此,这些中间物形成一个自由能"货币",像葡萄糖氧化或脂肪酸氧化那样的产自由能

反应通过这些“货币”向生物系统中消耗自由能的过程“付帐”。

A. ATP 和磷酰基转移

存在于所有已知生命结构中的“高能”中间物三磷酸腺苷(ATP, 图 13-3)是主要的细胞的能量货币。它由一个**腺苷**(adenosine)部分(腺嘌呤 + 核糖)与三个磷酰基($—PO_3^{2-}$)依次通过一个**磷酸酯键**(phosphoester bond)和两个**磷酸酐键**(phosphoanhydride bond)连接所组成。

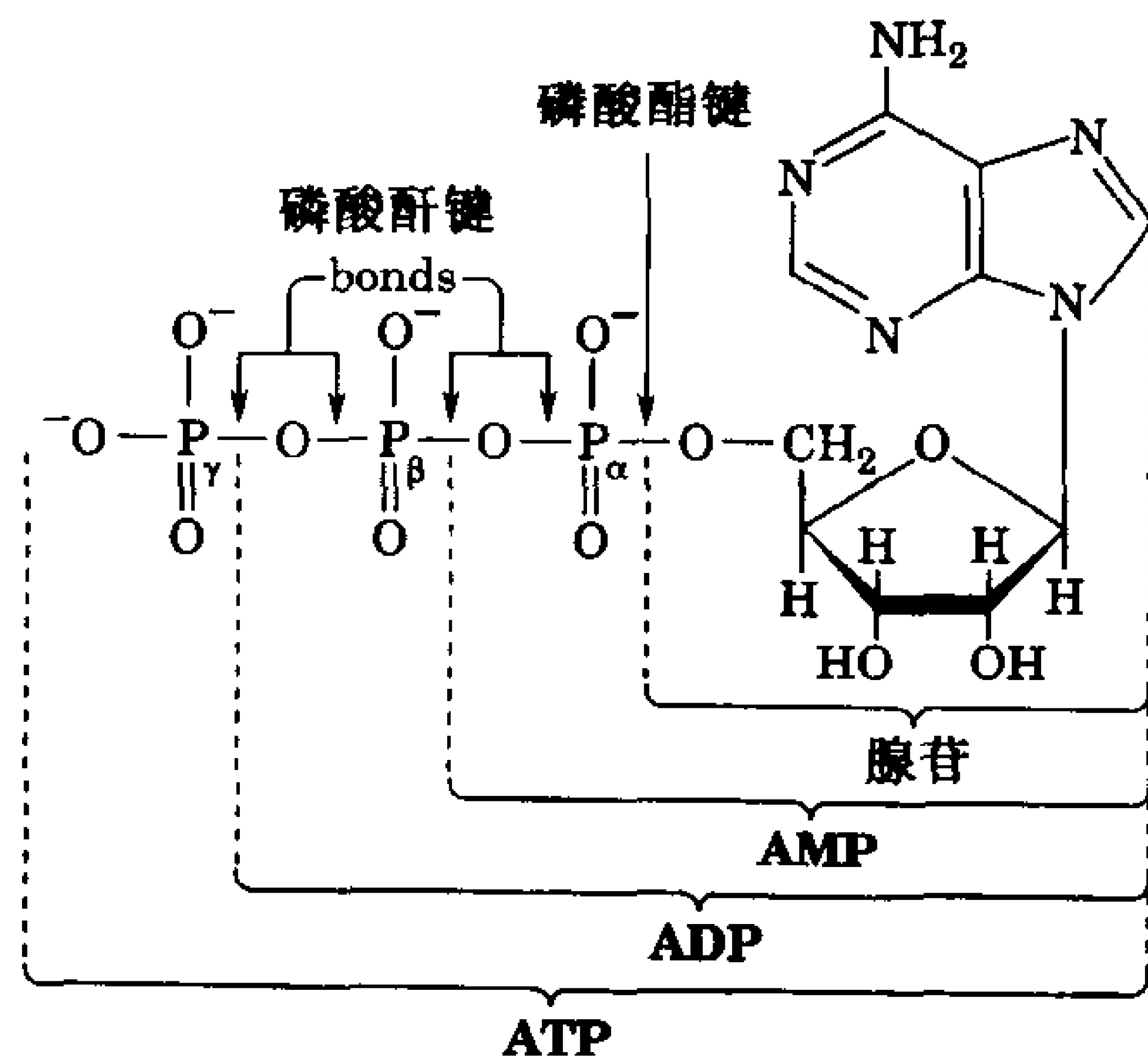
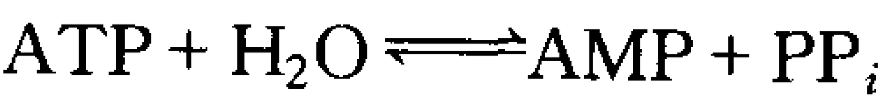


图 13-3　*结构的秘诀*:ATP 的结构及其与 ADP、AMP 及腺苷的关系
从 AMP 开始的磷酰基以 α、β、γ 表示,注意磷酸酯键与磷酸酐键之间的差别。

ATP 的生物学重要性在于其磷酸酐键断裂时伴随大量的自由能。它可以是磷酰基转移到另一化合物,余下 ADP;也可以是转移核苷酸(AMP)基而余下**焦磷酸**(pyrophosphate)($P_2O_7^{4-}$; PP_i)。当受体是水时,该过程是水解: 362



$$ATP + H_2O \rightleftharpoons ADP + P_i$$



$$ATP + H_2O \rightleftharpoons AMP + PP_i$$

大多数生物基团转移反应的受体不是水。然而,知道了各种磷酰化合物水解的自由能,我们可以通过确定磷酰供体和受体水解自由能的差来计算磷酰基转移到其他受体上的能量。

表 13-2 列出生物化学上重要的一些磷酸化合物水解的 $\Delta G°'$ 值。这些值的负数常常被称为**磷酰基转移位能**(phosphoryl group-transfer potential),它们是磷酸化合物将其磷酰基转移给水的倾向的量度。注意 ATP 有着居间的磷酰基转移位能。在标准状况下,表 13-2 中位于 ATP 以上的化合物能自发地转移一个磷酰基给 ADP 形成 ATP。反之,ATP 自发地转移一个磷酰基给一适当的基团形成位于其下的化合物。

表 13-2　生物学上感兴趣的一些化合物磷酸水解时的标准自由能

化合物	$\Delta G°'/(kJ\cdot mol^{-1})$
磷酸烯醇式丙酮酸	-61.9
1,3-二磷酸甘油酸	-49.4
乙酰磷酸	-43.1

续表

化合物	$\Delta G^{\circ\prime}/(\mathrm{kJ \cdot mol^{-1}})$
磷酸肌酸	-43.1
PP_i	-33.5
ATP(→AMP + PP_i)	-32.2
ATP(→ADP + P_i)	-30.5
葡萄糖-1-磷酸	-20.9
果糖-6-磷酸	-13.8
葡萄糖-6-磷酸	-13.8
甘油-3-磷酸	-9.2

引自：Jencks, W. P. in Fasman, G. D. (Ed.), Handbook of Biochemistry and Molecular Biology(3rd. ed.), Physical and Chemical Data, Vol. I, PP. 296-304, CRC Press (1976)。

了解"高能"化合物中的"能量"

进行水解时 $\Delta G^{\circ\prime}$负值大的键(习惯上大于 $-25\ \mathrm{kJ \cdot mol^{-1}}$)常常称之为**"高能"键**("high-energy"bond)或**"富能"键**("energy-rich"bond),并经常用代字号(～)表示。因此 ATP 能表示为 AR—P～P～P,此处 A、R 和 P 分别代表腺嘌呤基、核糖基和磷酰基。然而 ATP 的腺嘌呤基与 α-磷酰基相连的磷酸酯键在电子特性上与连接其 α-和 β-磷酰基以及 β-和 γ-磷酰基的所谓"高能"键没有大的不同。事实上这些键中没有哪一个具有非常的性质,所以术语"高能"键多少是一个误称(无论如何,它不应与术语"键能"相混淆,键能的定义是断裂而非水解一个共价键所需的能量)。那么,为什么 ATP 的磷酰基转移反应是放能如此之多呢? 下列几个因素好像是磷酸酐键的"高能"特性的原因,以 ATP 的情况为例(图 13-4)。

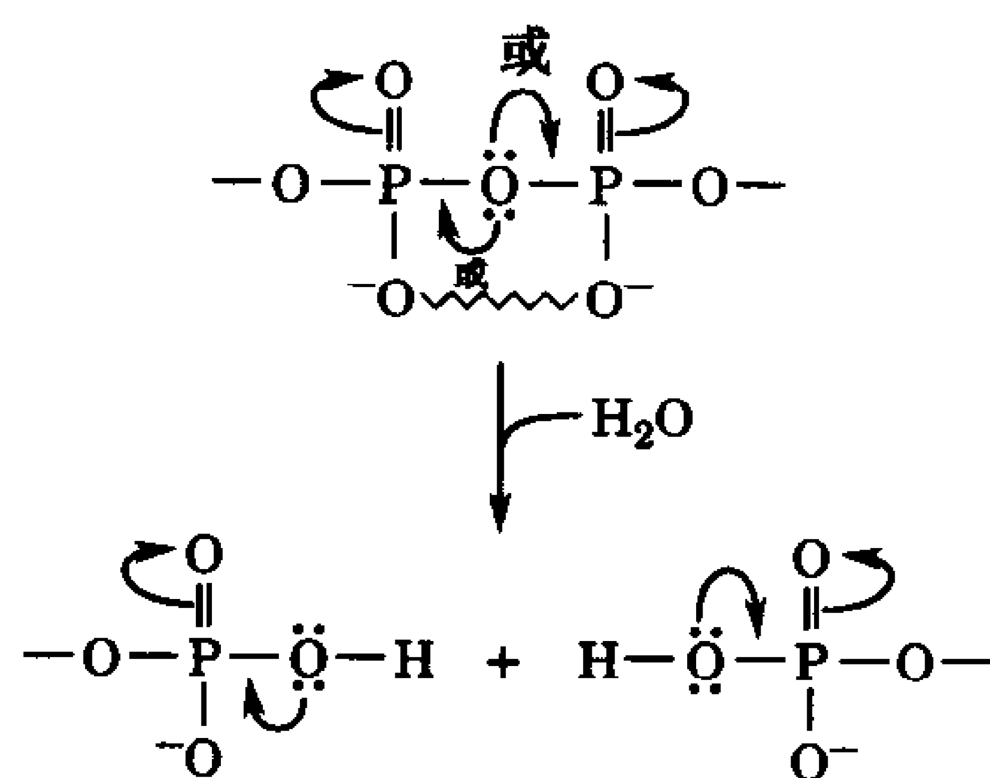


图 13-4 磷酸酐及其水解产物中的共振和静电稳定性

在磷酰基间的竞争性共振(从中间 O 的弯箭头)和电荷-电荷排斥(锯齿形)降低磷酸酐相对于其水解产物的稳定性。

1) 一个磷酸酐键的共振稳定性比它的水解产物的稳定性要小,这是因为一个磷酸酐的两个强吸电子基团必须竞争其跨接氧原子的 π 电子,而这种竞争在水解产物中是不存在的。换言之,磷酰基的电子要求在磷酸酐中比在它的水解产物中得到较少满足。
2) 可能更重要的是相对于其水解产物而言,一个磷酸酐的带电基团之间静电排斥的不稳定效应。在生理 pH 的范围,ATP 有 3～4 个负电荷,其相互的静电排斥由于 ATP 水解而部分地减轻。

3）另一个难以估计的不稳定影响是相对于其水解产物一个磷酸酐的溶合能(solvation energy)更小。某些估计提出，这个因素为磷酸酐的水解提供显著的热力学驱动力。　363

当然，任何反应的自由能变化，包括从一个“高能”化合物转移磷酰基，部分地依赖于反应物和产物的浓度(方程 13-1)。此外，因为 ATP 和它的水解产物是离子，ΔG 也依赖于 pH 和离子强度(见框 13-2)。

框 13-2　生物化学焦点

ATP 和 ΔG

以 $\Delta G^{\circ\prime}$表示的标准状态永远不会发生在活有机体中。此外，以高浓度存在并可能与代谢途径中底物和产物相互作用的其他化合物可能戏剧性地影响 ΔG 值。例如细胞中的 Mg^{2+} 部分中 ATP 及其水解产物中的磷酸基上的负电荷，因而减弱使 ATP 水解放能巨大的静电排斥，与之类似，pH 的变化改变了磷酸化合物的离子特性，因而也改变它们的自由能。

在一个特定的细胞中，许多离子、辅酶和代谢物的浓度随所在位置和时间而改变，常达几个数量级。细胞内的 ATP 浓度维持在一相当窄的范围内，通常是 2～10mmol·L^{-1}，但 ADP 和 P_i 浓度的变化要大得多。考虑一个典型的细胞，[ATP] = 3.0mmol·L^{-1}，[ADP] = 0.8mmol·L^{-1}和[P_i] = 4.0mmol·L^{-1}。应用方程 13-1 计算 ATP 在 37℃ 水解的实际自由能如下。该值甚至大于 ATP 水解的标准自由能。然而，由于难以准确测量一个细胞或细胞器中特定化学物质的浓度，多数体内反应的 ΔG 稍大于估计值。为了始终一致，我们将在本书的大部分使用 $\Delta G^{\circ\prime}$。

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + RT\ln\left(\frac{[\mathrm{ADP}][\mathrm{P}_i]}{[\mathrm{ATP}]}\right)$$

$$= -30.5\ \mathrm{kJ\cdot mol^{-1}} + (8.3145\ \mathrm{J\cdot K^{-1}\cdot mol^{-1}}) \times (310\mathrm{K})$$

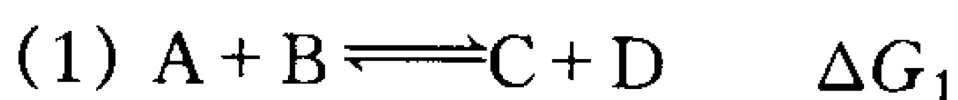
$$\times \ln\left(\frac{(0.8\times10^{-3}\mathrm{mol\cdot L^{-1}})(4.0\times10^{-3}\mathrm{mol\cdot L^{-1}})}{(3.0\times10^{-3}\mathrm{mol\cdot L^{-1}})}\right)$$

$$= -30.5\ \mathrm{kJ\cdot mol^{-1}} - 17.6\ \mathrm{kJ\cdot mol^{-1}}$$

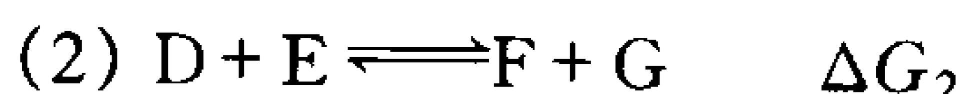
$$= -48.1\ \mathrm{kJ\cdot mol^{-1}}$$

B. 偶联反应

“高能”化合物的放能反应能与吸能过程偶联使其完成。对于偶联放能与吸能过程的热力学解释是基于自由能的可加性。考虑下面的两步反应途径：



$$(1)\ \mathrm{A + B \rightleftharpoons C + D} \qquad \Delta G_1$$



$$(2)\ \mathrm{D + E \rightleftharpoons F + G} \qquad \Delta G_2$$

假如 $\Delta G_1 \geqslant 0$，反应 1 不会自发地发生。然而如果 ΔG_2 是充分放能的，以致 $\Delta G_1 + \Delta G_2 < 0$，那么虽然 D 在反应 1 中的平衡浓度相当小，它将大于在反应 2 中的浓度。当反应 2 转变 D 成产物时，反应 1 将正向进行以补充 D 达到平衡浓度，因此高度放能的反应 2“驱使”或“拉动”吸能反应 1，这两个反应被认为通过它们共同的中间物 D 而偶联。这些自发进行的偶联反应也能看成反应 1 和 2 相加的总反应：　364



$$(1+2) \qquad \mathrm{A + B + E \rightleftharpoons C + F + G} \qquad \Delta G_3$$

此处 $\Delta G_3 = \Delta G_1 + \Delta G_2 < 0$。只要该总途径是放能的，它将按正向进行。

为了阐述这一概念，让我们考虑两例磷酰基转移反应。葡萄糖代谢的起始步骤是葡萄糖转

变成**葡萄糖-6-磷酸**[glucose-6-phosphate)(节 14-2A]。但葡萄糖与 P_i 直接反应是热力学不利的($\Delta G^{\circ\prime}=+13.8\ kJ\cdot mol^{-1}$)(图 13-5a)。然而在细胞中这个反应是与 ATP 的放能裂解偶联的(对于 ATP 水解,$\Delta G^{\circ\prime}=-30.5\ kJ\cdot mol^{-1}$),所以总反应是热力学上有利的($\Delta G^{\circ\prime}=+13.8-30.5=-16.7\ kJ\cdot mol^{-1}$)。ATP 能类似地被再生($\Delta G^{\circ\prime}=+30.5\ kJ\cdot mol^{-1}$),这是将 ADP 和 P_i 合成 ATP 与更为放能的**磷酸烯醇式丙酮酸**(phosphoenolpyruvate)裂解($\Delta G^{\circ\prime}=-61.9\ kJ\cdot mol^{-1}$)(图 13-5b 和节 14-2J)偶联。

磷酸酐水解驱动一些生化过程

高能化合物如 ATP 的磷酸酐键的自由能可用以驱动反应达到平衡,即使磷酰基不转移到另一有机化合物上也会如此。例如 ATP 水解(即磷酰基直接转移给 H_2O)提供自由能用于分子伴侣的操作(节 6-4C),肌肉收缩(节 7-3)和跨膜的主动运输(节 10-4C)。在这些过程中蛋白质由于与 ATP 结合而发生构象变化。*ATP 的放能水解和释放 ADP 和 P_i 使这些变化不可逆,因而驱动过程向前*。GTP 水解在功能上类似,用于驱动信号转导(节 21-3B)和蛋白质合成(节 26-4)的一些反应。

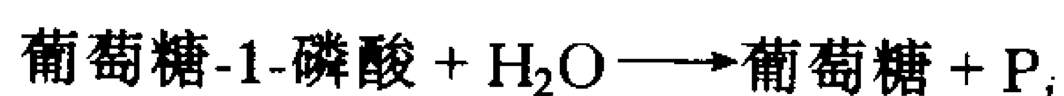
365

没有适当的酶时,磷酸酐键是稳定的,也就是说它们水解十分慢,尽管这些反应会释放大量的自由能。这是因为这些水解反应有非常高的活化自由能($\Delta G^{\ddagger}$)(节 11-2)。因此,*ATP 水解是热力学上有利而动力学上不利的*。例如,考虑葡萄糖与 ATP 反应产生葡萄糖-6-磷酸(图 13-5a)。从 ATP 非酶促转移一个磷酰基给葡萄糖的 $\Delta G^{\ddagger}$ 值比 ATP 水解要大,所以水解反应占优势(尽管没有一个反应以生物学上显著的速率发生)。然而,存在**己糖激酶**(hexokinase)(节 14-2A)时,葡萄糖-6-磷酸的形成远较 ATP 的水解快得多。这是因为酶的催化效应将从 ATP 转移磷酰基给葡萄糖的活化能降低到少于 ATP 水解的活化能。这个例子明确表示,即使是一个热力学有利的反应($\Delta G<0$),如果活体中不存在催化它的特定酶(即降低 $\Delta G^{\ddagger}$ 来增加产物形成的速率)(框 12-2)时,该反应可能不会发生。

实例计算　1

计算葡萄糖-1-磷酸在 37℃ 水解时的平衡常数。

对于反应



葡萄糖-1-磷酸 + $H_2O \longrightarrow$ 葡萄糖 + P_i

$\Delta G^{\circ\prime}=-20.9\ kJ\cdot mol^{-1}$(表 13-2)。在平衡时,

$\Delta G=0$,方程式 13-1 变成

$\Delta G^{\circ\prime}=-RT\ln K$。

因此,

$$K=e^{-\Delta G^{\circ\prime}/RT}$$

$$K=e^{-(-20\,900\ J\cdot mol^{-1})/(8.3145\ J\cdot K^{-1}\cdot mol^{-1})(310K)}$$

$$K=3.3\times10^{3}$$

无机焦磷酸酶催化另一些磷酸酐键的裂解

虽然含有 ATP 的许多反应产生 ADP 和 P_i[**正磷酸裂解**(orthophosphate cleavage)],其他的

(a)

				$\Delta G^{\circ\prime}(kJ \cdot mol^{-1})$
吸能的 半反应 1	P_i + 葡萄糖	⇌	葡萄糖-6-P + H_2O	+13.8
放能的 半反应 2	ATP + H_2O	⇌	ADP + P_i	-30.5
加合 总反应	ATP + 葡萄糖	⇌	ADP + 葡萄糖-6-P	-16.7

(b)

				$\Delta G^{\circ\prime}(kJ \cdot mol^{-1})$
放能的 半反应 1	$CH_2{=}C(COO^-)(OPO_3^{2-})$ + H_2O 磷酸烯醇式丙酮酸	⇌	$CH_3{-}C({=}O){-}COO^-$ + P_i 丙酮酸	-61.9
吸能的 半反应 2	ADP + P_i	⇌	ATP + H_2O	+30.5
加合 总反应	$CH_2{=}C(COO^-)(OPO_3^{2-})$ + ADP	⇌	$CH_3{-}C({=}O){-}COO^-$ + ATP	-31.4

图 13-5 一些包含 ATP 的偶联反应

(a)葡萄糖磷酸化形成葡萄糖-6-磷酸和 ADP。(b)ADP 被磷酸烯醇式丙酮酸磷酸化形成 ATP 和丙酮酸。每个反应概念上被分解成一个直接的磷酸化步骤(半反应 1)和 ATP 被水解的步骤(半反应 2),这两个反应的进行使总反应是放能的($\Delta G<0$)。

反应产生 AMP 和 PP_i[**焦磷酸裂解**(pyrophosphate cleavage)]。在后种情况下,PP_i 被**无机焦磷酸酶**(inorganic pyrophosphatase)迅速水解成两个 P_i($\Delta G^{\circ\prime}=-33.5\ kJ \cdot mol^{-1}$),所以 *ATP 的焦磷酸裂解最终消耗两个"高能"磷酸酐键*。这种现象的一个例子是氨基酸附着于 tRNA 分子上来合成蛋白质(图 13-6 和节 26-2B)。主要反应的两步容易可逆进行,因为所形成的键的水解自由能与 ATP 水解的相当。PP_i 的不可逆水解使总反应得以完成。从核苷三磷酸生物合成核酸也释放 PP_i(节 24-1 和节 25-1)。这些反应的自由能变化大致为零,所以后继的 PP_i 水解反应对于核酸的合成也是绝对必要的。

C. 其他的磷酸化合物

366

ATP 以外的"高能"化合物对于能量代谢是很重要的,部分原因是因为它们有助于将细胞的 ATP 保持在相对恒定的水平。*ATP 被不断地水解和再生*。的确,实验证据表明 ATP 分子的代谢半衰期从数秒到数分钟,取决于细胞的类型和代谢活力。例如,脑细胞只有数秒钟的 ATP 储存(这部分地说明脑组织由于缺氧而迅速变坏)。一般人休息时消耗和再生 ATP 的速率约为每小时 3mol(1.5kg),剧烈活动时要快一个数量级。

正如 ATP 通过磷酰基转移和磷酸酐水解的放能过程驱动吸能反应那样,*ATP 本身能通过与一个更高的放能代谢过程偶联而得以再生*。如表 13-2 所示,在磷酰转移化合物的热力学等级中 ATP 属于中间位置,因此,ATP 能通过一"高能"化合物(如磷酸烯醇式丙酮酸,图 13-5b 和节 14-2J)将其一个磷酰基直接转移给 ADP 来形成。这种反应称为**底物水平磷酸化**(substrate-level phosphorylation)。其他的机制利用跨膜的质子浓度梯度提供的能量间接地产生 ATP。在氧化

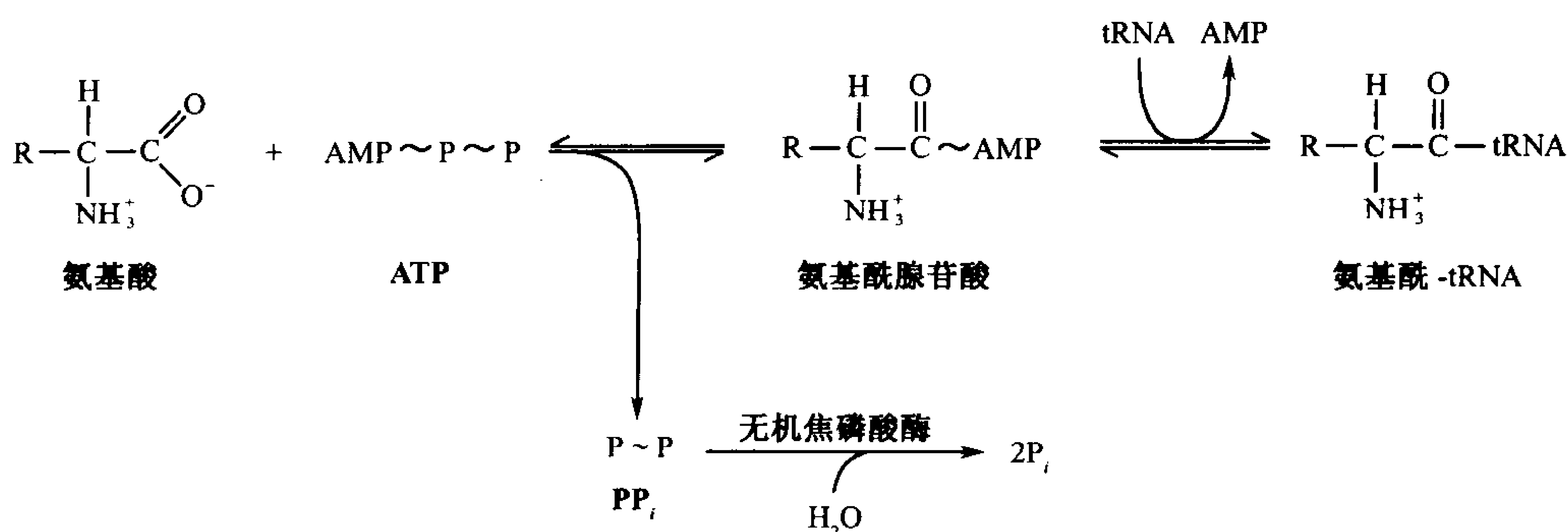


图 13-6 合成氨酰基 tRNA 时焦磷酸的裂解

在第一步反应,氨基酸被 ATP 腺苷酰化;第二步则是 tRNA 分子取代 AMP,部分形成氨基酰-tRNA。焦磷酸高度放能的水解($\Delta G^{\circ\prime} = -33.5\ kJ \cdot mol^{-1}$)使反应前进。

代谢中这种过程被称为**氧化磷酸化作用**(oxidative phosphorylation)(节 17-3),而在光合作用中,则命名为**光合磷酸化作用**(photophosphorylation)。

图 13-7 表示能量从"高能"磷酸化合物向 ATP 以及从 ATP 向"低能"磷酸化合物的流动,催化这些反应的酶称为**激酶**(kinase),它将 ATP 的磷酰基转移给其他化合物或从其他磷酸化合物将磷酰基转移给 ADP。在第 14 和 15 章讨论碳水化合物代谢时,我们将再谈这些过程。

转磷酰基位能大于 ATP 的化合物,有附带的稳定效应。例如,**乙酰磷酸**(acetyl phosphate)和 **1,3-二磷酸甘油**(1, 3-bisphosphoglycerate)那样的**酰基磷酸**(acyl phosphate)(混合磷酸-羧酸酐)的水解被相同的竞争共振和影响酸酐水解的不同的溶合效应所驱动(图 13-4)。很清楚,这些效应对酰基磷酸的影响比对磷酸酐更明显,如表 13-2 的顺序所示。

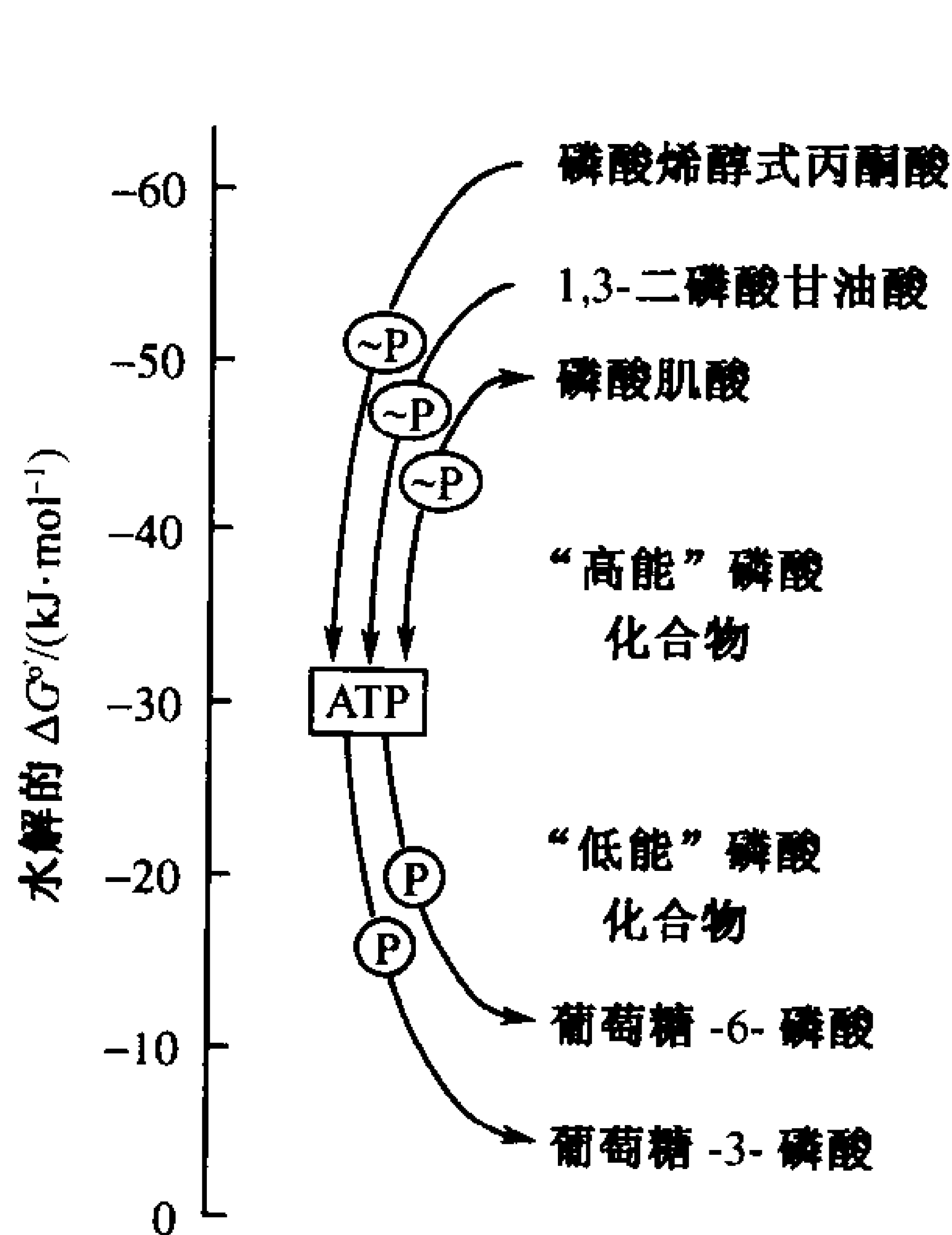
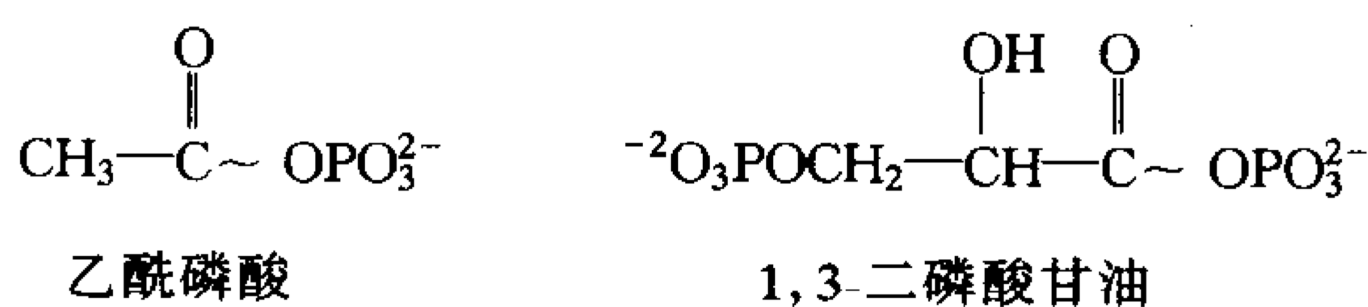


图 13-7 ATP 在"高能"与"低能"磷酸化合物之间的位置

磷酰基通过 ATP-ADP 体系从"高能"供体流向"低能"受体。

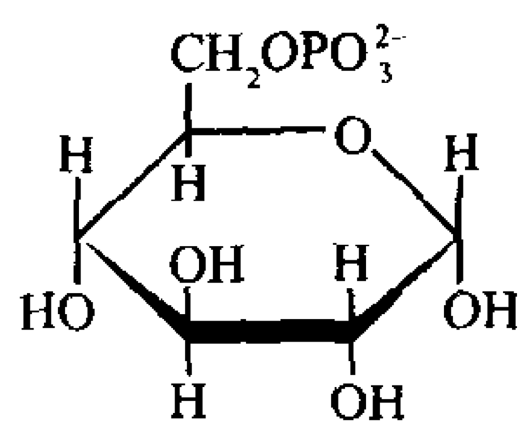


与之相反,像葡萄糖-6-磷酸和**甘油-3-磷酸**(glycerol-3-phosphate)那样在表 13-2 中位于 ATP 以下的化合物比起它们的水解产物其共振稳定性或电荷分离没有显著不同。因此,水解的自由能较前面的"高能"化合物要低得多。

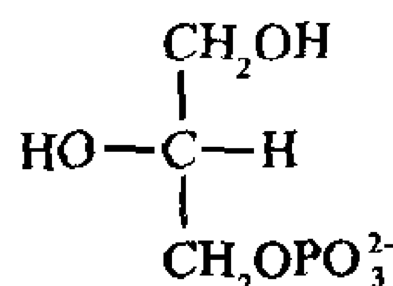
像**磷酸肌酸**(phosphocreatine)和**磷酸精氨酸**(phosphoarginine)那样的**磷酸胍**(phosphoguanidine),其高磷酰基转移位能主要由于**胍基**(guanidino)的竞争共振,这些甚至比磷酸酐的磷酸基更明显。因此,磷酸肌酸能将其磷酰基转移给 ADP 形成 ATP。

磷酸肌酸为 ATP 的形成提供一个"高能"库

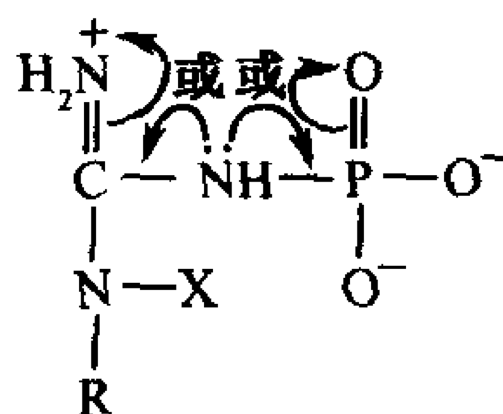
肌肉和神经细胞的 ATP 周转率高,依赖于磷酸胍迅速再生 ATP。脊椎动物合成磷酸肌酸是 ATP 由

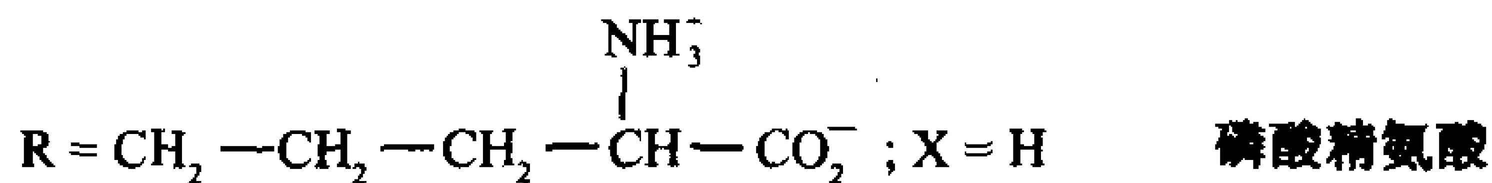


葡萄糖-6-磷酸



甘油-3-磷酸





磷酸肌酸



磷酸精氨酸

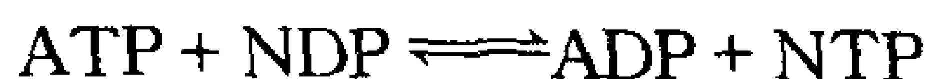
肌酸激酶(creatine kinase)催化将肌酸可逆地磷酸化：

$$\text{ATP + 肌酸} \rightleftharpoons \text{磷酸肌酸 + ADP} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = +12.6\ \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

注意这个反应在标准状态下是吸能的。*然而，细胞内反应物和产物的浓度使反应近于平衡*($\Delta G \approx 0$)。因此，当细胞处于静息状态时，[ATP]相对较高，反应朝净合成磷酸肌酸的方向进行，但在代谢活力高的时候，[ATP]低，平衡改变方向，从磷酸肌酸和 ADP 净合成 ATP。*因而在含有肌酸激酶的细胞中磷酸肌酸的作用是 ATP"缓冲器"*。一个静息状态的脊椎动物骨骼肌通常有足够的磷酸肌酸来提供其自由能的需要达数分钟(但在最大运用时仅维持少数几秒钟)。在一些无脊椎动物如龙虾的肌肉中，磷酸精氨酸履行同样的功能。这些磷酸胍总称为**磷酸原**(phosphagen)。

核苷三磷酸是自由互变的

许多生物合成过程，例如蛋白质和核酸合成，需要 ATP 以外的核苷三磷酸。例如 RNA 的合成需要核糖核苷酸 CTP、GTP、UTP 和 ATP，而 DNA 合成需要 dCTP、dGTP、dTTP 和 dATP(节 3-1)。所有这些核苷三磷酸(**NTP**)是由 ATP 和相应的核苷二磷酸(**NDP**)合成的，该反应由非专一的酶**核苷二磷酸激酶**(nucleoside diphosphate kinase)催化：



$$\text{ATP + NDP} \rightleftharpoons \text{ADP + NTP}$$

这些反应的 $\Delta G^{\circ\prime}$ 值近于零，这从 NTP 的结构类似物可以预料到。这些反应由于 NTP 的消耗而被推动，其放出的能量为后继的反应所利用。

其他的激酶可逆地转变核苷单磷酸成核苷二磷酸并耗费 ATP。一个这样的磷酰基转移反应是被**腺苷酸激酶**(adenylate kinase)催化的：　368



$$\text{AMP + ATP} \rightleftharpoons \text{2ADP}$$

此酶存在于所有组织中，其功能是维持这三个核苷酸浓度的平衡。当 AMP 积累时，它能变成 ADP，再通过底物水平磷酸化作用、氧化磷酸化作用或光合磷酸化作用合成 ATP。当迅速消耗 ATP 增加 ADP 水平时，可逆反应帮助恢复细胞的 ATP 水平。

由 Georg Schulz 测定的腺苷酸激酶的 X 射线结构显示，在由该酶催化的反应中，酶的两个约

30 个残基的结构域与底物接近(图 13-8),因而紧紧与底物相连接并避免水进入活性位点(它将导致水解而不是磷酰基的转移)。一个结构域的运动依赖于存在 4 个不变的带电残基,这些基团与结合的底物之间的相互作用引发底物结合位点周围的重排(图 13-8b)。

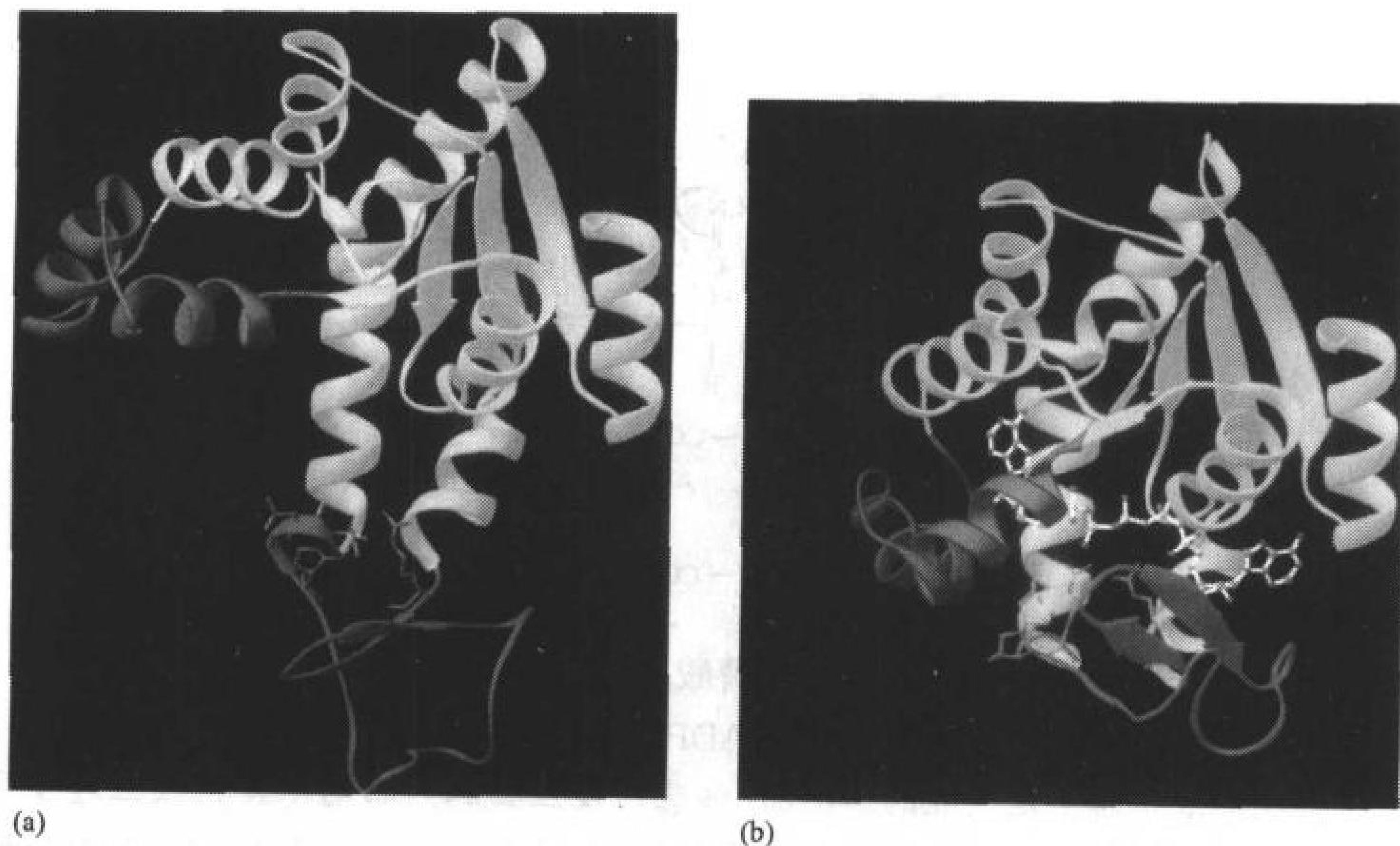


图 13-8　腺苷酸激酶结合底物时构象的变化

(a)无配体的酶。(b)结合双底物类似物 Ap_5A 的酶,Ap_5A 以球和棒形表示(C 绿、N 黑、O 红和 P 黄)。已经包含在底物结合中的一些蛋白质侧链以棒形表示。配位结合时蛋白质的品红色和青绿色结构域发生大范围的构象变化,然而蛋白质的其余部分(金色),它在a和b中的方位是相同的,大致保持其构象。(引自 Georg Schulz,德国弗莱堡,有机化学和生物化学研究所)

一旦腺苷酸激酶反应完成,与其紧密结合的产物必须迅速释出以保持酶的催化效率。然而因为该反应在能量上是中性的(磷酸酐键的净数不变),迅速释放产物需要另外的自由能来源。将未配位的核苷酸激酶结构和与双底物模式化合物 **AP_5A**(AMP 和 ATP 与第五个磷酸连接)结合的核苷酸激酶的 X 射线进行比较,显示了该酶如何避免紧密结合的底物和产物的动力学陷井:在结合底物时,远离活性位点的一部分蛋白质增加它的链的流动性,因而消耗一些连接底物的自由能;当结合位点开放并且产物离开时,该区域"重新稳固"。这一机制被认为作为一种"能量平衡物"帮助核苷酸激酶保持高反应速率。

D. 硫酯

代谢中到处存在磷酸化的化合物是与它们早期进化状况相一致的。然而在无生命世界磷酸是少见的,这显示甚至在代谢途径专限于磷酸化化合物之前,可能有其他的分子是富能化合物。作为原始的"高能"化合物的一个可能代表是**硫酯**(thioester),因为它存在于所有已知生物的中心代谢途径中。值得注意的是,硫酯键存在于底物水平磷酸化作用之中,它是独立于并可能先于氧化磷酸化作用的一种产 ATP 过程。

在现代的代谢途径中硫酯键是以反应中间物(包括酶活性位点上的半胱氨酸)和乙酰-CoA

(图 13-9)的形式出现的,乙酰 CoA 是糖、脂肪酸以及氨基酸分解反应的共同产物。**辅酶 A** (Coenzyme A, **CoASH** 或 **CoA**)由 β-巯基乙醇胺与维生素**泛酸**(pantothenic acid)以酰胺键连接,后者经焦磷酸桥与 3-磷酸腺苷单体相连。乙酰 CoA 的乙酰基与 β-巯基乙醇胺的巯基部分作硫酯连接。因此 CoA 的功能是乙酰基和其他酰基(辅酶 A 的 A 表示乙酰化作用)的载体。硫酯也采取酰基与磷酸泛酰巯基乙胺残基相连的形式,后者与蛋白质的 Ser 羟基相连,而不是像在 CoA 中那样与 AMP 相连。

369

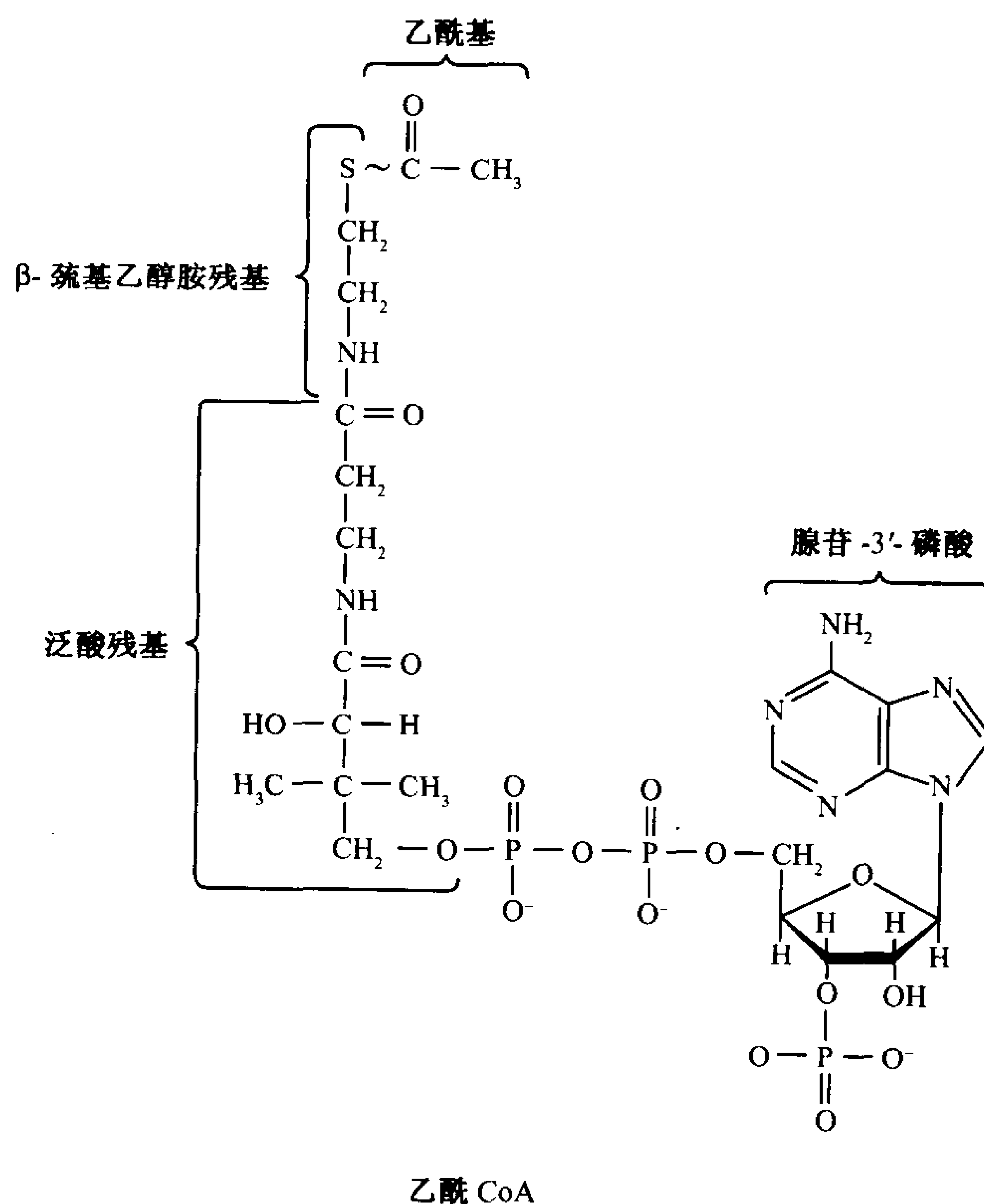


图 13-9　乙酰 CoA 的化学结构
硫酯键画成"～"表明它是一个"高能"键。在 CoA 中,该乙酰基由氢代替。

乙酰 CoA 是一个"高能"化合物,它的硫酯键水解时 $\Delta G^{\circ\prime}$ 是 $-31.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$。比 ATP 水解时放能稍多一点($1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)。硫酯比普通的酯水解时放能更多,因为硫酯共振比较不稳定。这种不稳定性是因为 S 的原子半径大,这样 C 和 S 之间的电子重叠比 C 和 O 之间的要小。

代谢中间物形成硫酯键会使一个代谢燃料氧化的部分自由能贮存起来,该自由能再用于驱动一个吸能反应[①]。例如在柠檬酸循环中,一个硫酯(**琥珀酰 CoA**)的裂解释放足够的自由能用于从 GDP 和 P_i 合成 GTP(节 16-3E)。

① 原文误为放能反应。——译者注

3. 氧化－还原反应

当代谢燃料氧化成 CO_2 时，电子转移给分子载体，在需氧的生物中，最终将电子传递给分子氧。电子传递过程造成跨膜的质子浓度梯度，它驱动 ATP 的合成（氧化磷酸化作用）（节 17-3）。甚至不进行氧化磷酸化的专性厌氧菌，也依靠底物的氧化来驱动 ATP 合成。事实上，氧化还原反应提供生物大部分的自由能。在本节我们要考查底物氧化时自由能被保存的热力学基础。

A. NAD^+ 和 FAD

370

两个最广泛存在的电子载体是核苷酸辅酶烟酰胺腺嘌呤二核苷酸（NAD^+）和黄素腺嘌呤二核苷酸（FAD）。NAD^+（以及它的磷酸化的反副本 $NADP^+$）（图 3-4）的烟酰胺部分是可逆还原的位点，以转移氢阴离子（H^-，带两个电子的质子）的形式发生，如图 13-10 所示。需氧生物的最终电子受体 O_2 仅能接受未配对的电子；也就是说电子必须一次一个地转移到 O_2 上。从代谢物成对移开的电子（例如 NAD^+ 两个电子还原）必须转移到能进行一个电子氧化还原反应的其他载体上。FAD（图 3-3）就是这样的一种辅酶，它能进行单电子和双电子的转移。

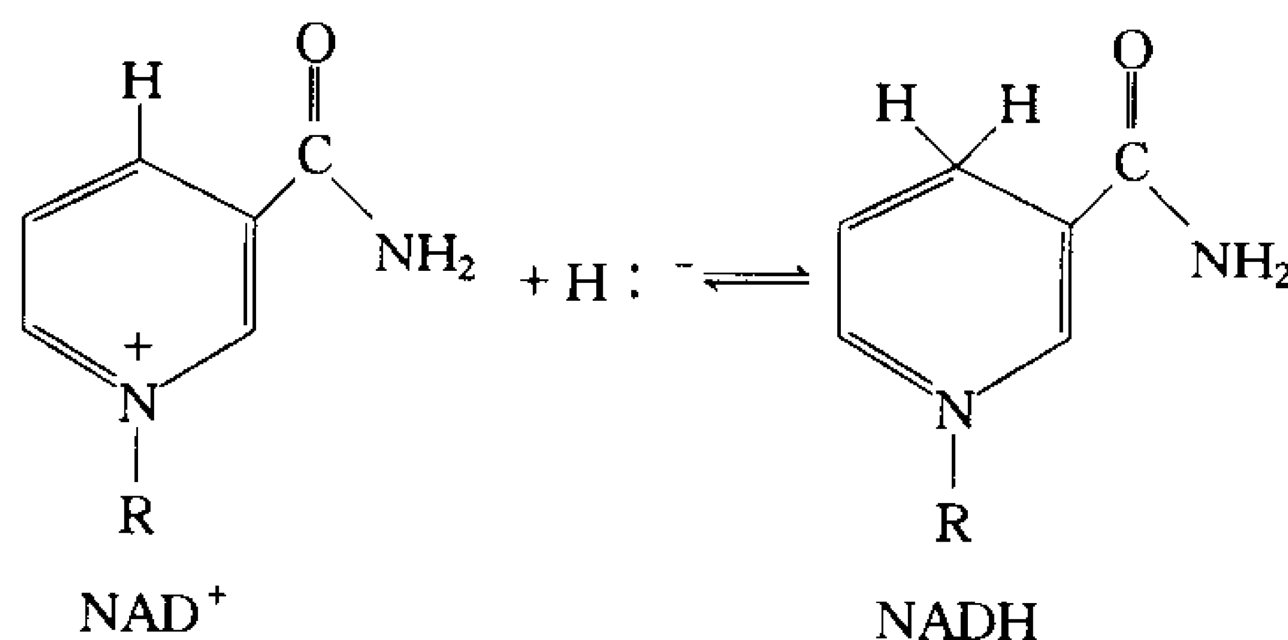


图 13-10 NAD^+ 还原成 NADH

R 代表辅酶的核糖-焦磷酸-腺苷部分。还原时只有此烟酰胺环起作用，这里形式上表示发生氢阴离子转移。

FAD 的共轭环系能接受一个或两个电子生成稳定的自由基（半醌）FADH·或完全还原的（氢醌）$FADH_2$（图 13-11）。还原时环系电子状态的变化用颜色从亮黄（FAD 中）变到灰黄（$FADH_2$ 中）来表示。NAD^+ 和 FAD 的代谢功能要求它们进行可逆还原以接受电子，将电子传给其他的电子载体，并因此再生以参与别的氧化还原循环。

人类不能合成 FAD 的黄素部分而必须从其饮食中获取，例如，核黄素（维生素 B_2）（图 3-3）。因此很少有人缺少核黄素，部分因为黄素辅基紧紧地与其脱辅基酶结合。核黄素缺少的症状（它们与一般的营养不良或奇怪的饮食有关联）有舌头发炎、口角损伤和皮肤炎。

B. Nernst 方程

氧化-还原反应与其他类型的基团转移反应相似，只是反转移的"基团"是电子，它们是从一个**电子供体**（electron donor）即**还原剂**（reductant agent 或 reducing agent）传给一个**电子受体**（electron acceptor）即氧化剂（oxidant agent 或 oxidizing agent）。例如，反应



$$Fe^{3+} + Cu^+ \rightleftharpoons Fe^{2+} + Cu^{2+}$$

371

中，还原剂 Cu^+ 被氧化成 Cu^{2+}，而氧化剂 Fe^{3+} 被还原成 Fe^{2+}。

氧化还原反应能分成两个**半反应**（half-reaction）或**氧化还原对**（redox couples），例如

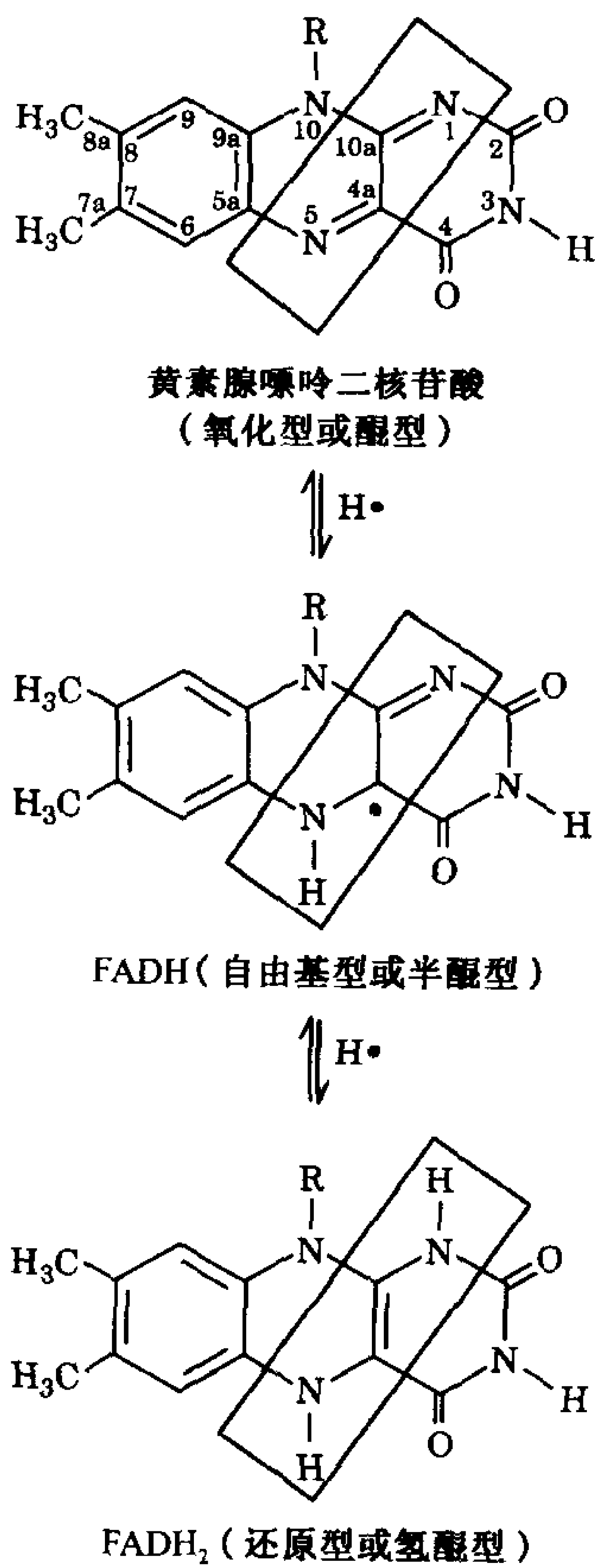
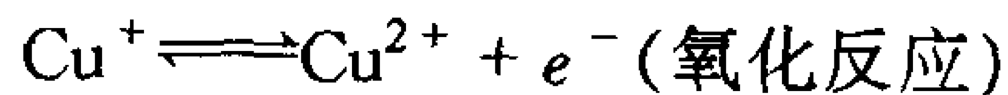


图 13-11　FAD 还原成 $FADH_2$

R 代表该辅酶的核糖醇-焦磷酰-腺苷部分。FAD 的共轭环系统进行两个连续的单电子还原或者进行旁路半醌状态的双电子转移。



$$Fe^{3+} + e^- \rightleftharpoons Fe^{2+} \text{（还原反应）}$$



$$Cu^+ \rightleftharpoons Cu^{2+} + e^- \text{（氧化反应）}$$

它的总和是上面的全反应。当线粒体中细胞色素 *c* 氧化酶氧化时发生这些特殊的半反应（节 17-2F）。注意，对于被转移的电子，两个半反应必须同时发生。事实上，电子是这两个半反应的共同的中间物。

电化学池

一个半反应由一个电子供体和与其成对的电子受体组成，在上面表示的氧化半反应中，Cu^+ 是电子供体而 Cu^{2+} 是其成对的电子受体。将其合在一起构成了一个与成对的酸-碱对（HA 和 A^-）（节 2-2B）相似的**成对的氧化还原对**（conjugate redox pair），但氧化还原对和酸碱对之间的重要区别是一个氧化还原反应的两个半反应，每个由一成对的氧化还原对组成，能用物理方法分开形成一个**电化学池**（electrochemical cell）（图 13-12）。在此装置中，每个半反应在其分开的**半反应池**（half-cell）中发生，电子在半反应池之间通过，即连接两电极的导线上有电流。要完成该电路，

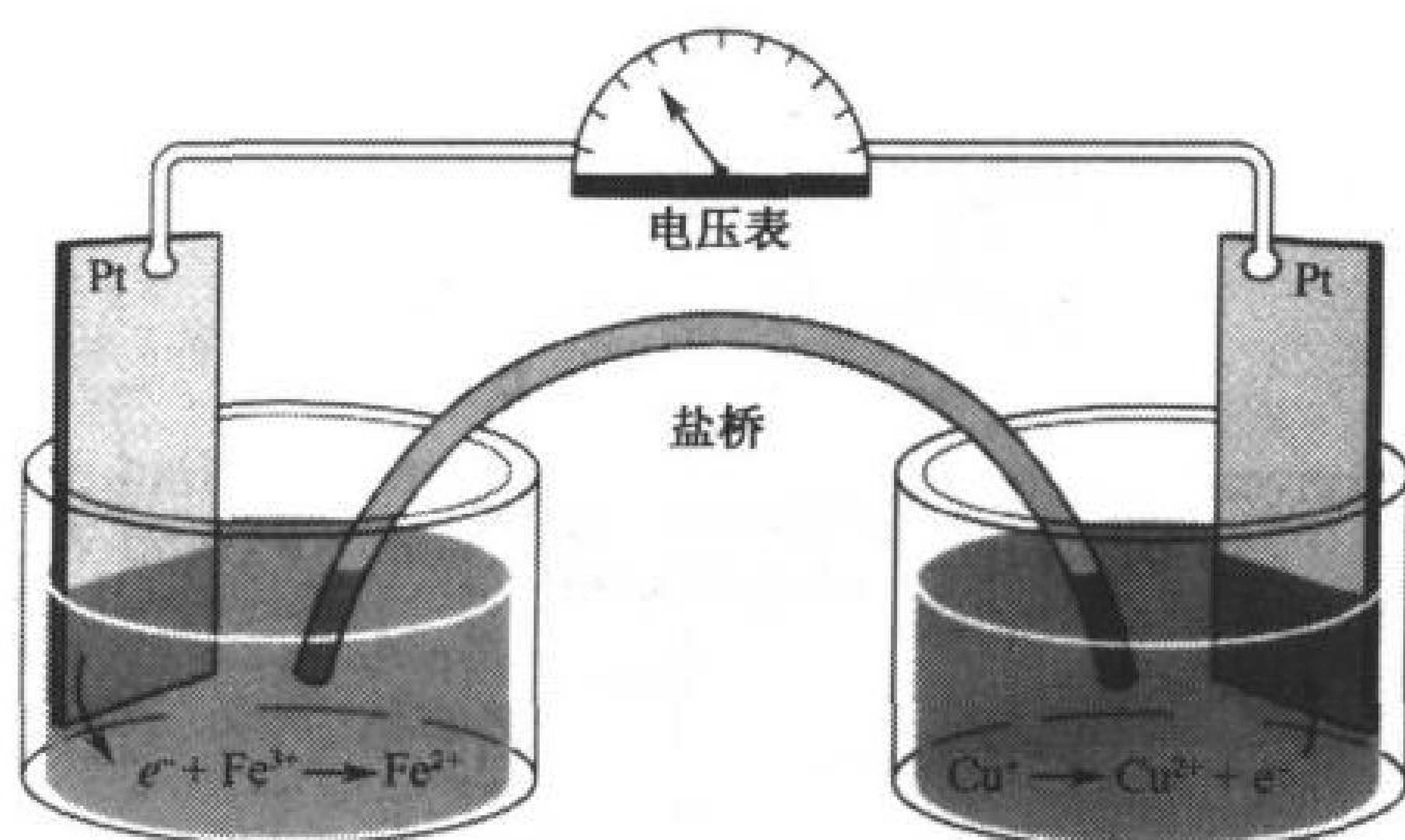


图 13-12　一个电化学池

半反应池经氧化作用(此处 $Cu^{+} \longrightarrow Cu^{2+} + e^{-}$)将释放的电子通过导线传给进行还原作用(此处 $e^{-} + Fe^{3+} \longrightarrow Fe^{2+}$)的半反应池。这两个半反应池的电中性是通过含电解质的盐桥转移离子来维持的。

必须有一个盐桥作为离子迁移的通道以维持电中性。

一个氧化还原反应的自由能可以特别容易地通过简单测量它的两个半反应池间的电压差来测定。考虑一般的反应



$$A_{ox}^{n+} + B_{red} \rightleftharpoons A_{red} + B_{ox}^{n+}$$

其中每摩尔反应物的 n 个电子从还原剂(B_{red})转移给氧化剂(A_{ox}^{n+})。此反应的自由能表示为

$$\Delta G = \Delta G^{\circ} + RT\ln\left(\frac{[A_{red}][B_{ox}^{n+}]}{[A_{ox}^{n+}][B_{red}]}\right) \qquad [13\text{-}3]$$

372　在可逆条件下,

$$\Delta G = -w' = -w_{el} \qquad [13\text{-}4]$$

此处 w'是非压力-体积功。在这种情况, w'等于 w_{el}, 它是经过电位差 $\Delta\mathscr{E}$ 转移 n 摩尔电子所需的电功[这里是 $\mathscr{E}$ 的单位是伏特(V), 转移 1 库仑(C)电荷所需的功的焦耳数(J)]。根据静电学定律, 得出

$$w_{el} = n\mathscr{F}\Delta\mathscr{E} \qquad [13\text{-}5]$$

此处 $\mathscr{F}$ **法拉第常数**是 1 摩尔电子所带的电荷($1\ \mathscr{F} = 96\ 485\ C \cdot mol^{-1} = 96\ 485\ J \cdot V^{-1} \cdot mol^{-1}$); 而 n 是每摩尔被转化的反应物转移电子的摩尔数。因此, 方程 13-5 代入方程 13-4 得到,

$$\Delta G = -n\mathscr{F}\Delta\mathscr{E} \qquad [13\text{-}6]$$

合并方程 13-3 和 13-6, 并对 ΔG°作相似代入, 产生 **Nernst 方程**:

$$\boxed{\Delta\mathscr{E} = \Delta\mathscr{E}^{\circ} - \frac{RT}{n\mathscr{F}}\ln\left(\frac{[A_{red}][B_{ox}^{n+}]}{[A_{onx}^{n+}][B_{red}]}\right)} \qquad [13\text{-}7]$$

它是 1881 年由 Walther Nernst 最先制定的, 此处的 $\Delta\mathscr{F}$, **电动力**(electromotive force, emf)或**还原电位**(reduction potential), 它被描述为电化学池施加的“电子压力”。$\Delta\mathscr{E}^{\circ}$是当所有组分都在其标准状态时的还原电位, 称为**标准还原电位**(standard reduction potential)。假如这些标准状态指生化标准状态(节 1-4D), 则 $\Delta\mathscr{E}^{\circ}$用 $\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime}$代替。注意方程 13-6 中正的 $\Delta\mathscr{E}$ 造成负的 ΔG; 换言之, *正的 $\Delta\mathscr{E}$ 表示为一自发的反应, 能够做功。*

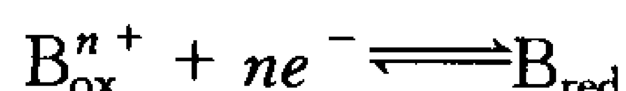
C. 还原电位的测量

方程式 13-6 表明能通过伏特计(图 13-12)直接测量一个氧化还原的还原电位来决定该反应的自由能变化。这些测量有可能决定一组电子载体中电子自发转移的顺序,例如调节细胞中的氧化磷酸化作用的电子转移途径的电子载体的顺序。

任何氧化还原反应能分成其组成的半反应:



$$A_{ox}^{n+} + ne^- \rightleftharpoons A_{red}$$



$$B_{ox}^{n+} + ne^- \rightleftharpoons B_{red}$$

此处为方便起见,两个半反应都写成还原反应,这些半反应的还原电位 $\mathscr{E}_A + \mathscr{E}_B$ 依据 Nernst 方程:

$$\mathscr{E}_A = \mathscr{E}^{\circ}{}_A - \frac{RT}{n\mathscr{F}}\ln\left(\frac{[A_{red}]}{[A_{ox}^{n+}]}\right) \qquad [13\text{-}8]$$

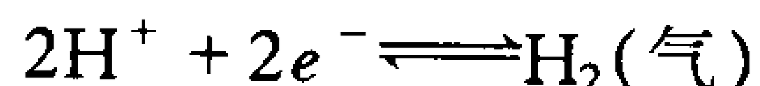
$$\mathscr{E}_B = \mathscr{E}^{\circ}{}_B - \frac{RT}{n\mathscr{E}}\ln\left(\frac{[B_{red}]}{[B_{ox}^{n+}]}\right) \qquad [13\text{-}9]$$

对这两个半反应的总的氧化还原反应而言,

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ} = \mathscr{E}^{\circ}{}_{(e^- 受体)} - \mathscr{E}^{\circ}{}_{(e^- 供体)} \qquad [13\text{-}10]$$

因此,当该反应以 A 作为电子受体而 B 作为电子供体进行时,$\Delta\mathscr{E}^{\circ} = \mathscr{E}^{\circ}{}_A - \mathscr{E}^{\circ}{}_B$,以及 $\Delta\mathscr{E} = \mathscr{E}_A - \mathscr{E}_B$。　373

还原电位像自由能那样必须定义为与一些任意的标准有关,在这种情况下,氢的半反应



$$2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2(气)$$

此处 H^+ 和与铂电极接触的 H_2(气)平衡。这个半反应池被任意地指定为在 pH 为 0, 25℃ 和 1atm 条件下,标准还原电位 $\mathscr{E}^{\circ}$ 为 0 V(1 V = 1 J·C^{-1})。按照生化惯例,标准状态是 pH 7.0,所以氢半反应的标准还原电位 $\mathscr{E}^{\circ\prime}$ 为 −0.421 V。

当 $\Delta\mathscr{E}$ 是正值时,ΔG 是负值(方程 13-6),表明是一个自发的过程。在标准状态下合并两个半反应,自发发生的方向是使较大的正值标准还原电位减小,换言之,*标准还原电位的正值越大,氧化还原对的氧化态对于电子的亲和力越高,亦即氧化还原对的氧化态接受电子的倾向更大,因而被还原。*

生化半反应在生理学上的重要性

一些生物化学上重要的半反应的生化标准还原电位($\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime}$)列于表 13-3。一个氧化还原对的氧化态如果标准还原电位正值大,则对于电子的亲和力高,是一个强的电子受体(氧化剂),而与其结合的还原剂则是一个弱的电子供体(还原剂)。例如 O_2 在表 13-3 中是最强的氧化剂,而 H_2O 紧紧地把持着它的电子,是所列的最弱的还原剂。反之,标准还原电位负值大的半反应也是如此。　374

因为电子自发地从低还原电位流往高还电位,在标准状态下,它们从表 13-3 的任何半反应的还原产物转移到表中位于其上的任何半反应的氧化反应物(虽然没有适当的酶时可能不存在可以测量到的速率)。注意,表 13-3 列出各种细胞色素的 Fe^{3+} 有明显不同的还原电位。这表明*氧化还原酶的蛋白质组分通过调整其所结合的氧化还原活性中心的还原电位,在电子传递反应中起主动的作用。*

表 13-3 一些生物化学上重要的半反应的标准还原电位

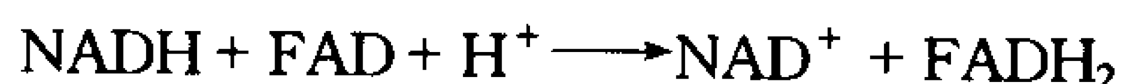
半　反　应	$\mathscr{E}^{\circ\prime}$/V
$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ 2e^- \rightleftharpoons H_2O$	0.815
$SO_4^{2-} + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons SO_3^{2-} + H_2O$	0.48
$NO_3^- + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NO_2^- + H_2O$	0.42
细胞色素 $a_3(Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons$ 细胞色素 $a_3(Fe^{2+})$	0.385
O_2(气) $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O_2$	0.295
细胞色素 $a(Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons$ 细胞色素 $a(Fe^{2+})$	0.29
细胞色素 $c(Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons$ 细胞色素 $c(Fe^{2+})$	0.235
细胞色素 $c_1(Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons$ 细胞色素 $c_1(Fe^{2+})$	0.22
细胞色素 $b(Fe^{3+}) + e^- \rightleftharpoons$ 细胞色素 $b(Fe^{2+})$(线粒体)	0.077
泛醌 $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 还原型泛醌	0.045
延胡索酸 $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 琥珀酸$^-$	0.031
$FAD + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons FADH_2$(黄素蛋白中)	≈0.
草酰乙酸$^-$ $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 苹果酸$^-$	-0.166
丙酮酸$^-$ $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 乳酸$^-$	-0.185
乙醛 $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 乙醇	-0.197
$FAD + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons FADH_2$(游离辅酶)	-0.219
$S + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2S$	-0.23
硫辛酸 $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 二氢硫辛酸	-0.29
$NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NADH$	-0.315
$NADP^+ + H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NADPH$	-0.320
胱氨酸 $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 2 半胱氨酸	-0.340
乙酰乙酸$^-$ $+ 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ β-羟基丁酸$^-$	-0.346
$H^+ + e^- \rightleftharpoons \frac{1}{2}H_2$	-0.421
乙酸$^-$ $+ 3H^+ + 2e^- \rightleftharpoons$ 乙醛 $+ H_2O$	-0.581

引自:大多数从 Loach, P. A., 在 Fasman, G. D. (Ed.), Handbook of Biochemistry and Molecalar Biology (3rd ed.) Physical and Chemical Data, Vol. I, PP. 123-130, CRC Press(1976)。

实例计算 2

计算 FAD 氧化 NADH 的 $\Delta G^{\circ\prime}$。

合并相应的半反应得到



$NADH + FAD + H^+ \longrightarrow NAD^+ + FADH_2$

按照方程 13-10,

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(e^-\text{受体})} - \mathscr{E}^{\circ}_{(e^-\text{供体})}$$
$$= \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(FADH_2/FAD)} - \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(NADH/NAD^+)}$$
$$= (-0.219\ V) - (-0.315\ V) = 0.096\ V$$
$$= 0.096\ J\cdot C^{-1}$$

因为 $\Delta G = -n\mathscr{F}\Delta\mathscr{E}$(方程 13-6),

$\Delta G^{\circ\prime} = -n\mathscr{F}\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime}$, 因此

$$\Delta G^{\circ\prime} = -(2mol\ e^-/mol\ \text{反应物}) \times (96\ 485\ C\cdot mol^{-1}e^-)(0.096\ J\cdot C^{-1})$$
$$= -18\ 500\ J\cdot mol^{-1}\text{反应物}$$
$$= -18.5\ kJ\cdot mol^{-1}\text{反应物}$$

电子传递反应在生物学上具有巨大的重要性。例如线粒体的电子传递链(节 17-2)中,电子从 NADH 沿一系列逐渐增加还原电位的电子受体(包括 FAD 和其他的受体,列于表 13-3)传递给 O_2。从 ADP 和 P_i 合成 ATP 也是由于将合成与这种自由能串联偶联在一起的。因此 NADH 的功能是一个富能的电子传递辅酶。事实上,一个 NADH 氧化成 NAD^+ 提供自由能可以产生三个 ATP。在许多放能代谢物的氧化中,NAD^+ 是电子受体,而在 ATP 合成中则作为电子供体,有如一个自由能管道履行其循环作用,与 ATP 相似(图 13-7)。

4. 代谢研究的实验方法

可在几个水平上理解一条代谢途径:

1) 从反应顺序的角度了解一个特殊的营养物转变成终产物,以及这些转变的能学。
2) 从机制的角度了解每个中间物转变成其后继者,这样的分析要求分离并鉴定催化每个反应的特定的酶。
3) 从调节代谢物通过代谢途径流动的调控机制的角度,这些包括器官间相互关系,它们按整个生物的需要调整代谢活性。

在所有这些水平上阐明一条代谢途径是一个复杂的过程,常常要求各种学科的贡献。

了解主要代谢途径的轮廓已有数十年,然而在许多情况下对存在于代谢途径各种步骤后面的酶学依然不明了。同样地,对于在不同生理条件下调节途径活性的机制也未完全了解。人们对这些领域有着很大的兴趣,因为它们可能产生的信息对改善人的健康和医治代谢疾病会有用处。此外,非寻常有机体,包括近来发现的“嗜极端的有机体”(extrmophiles)的尚未探究的代谢有希望提供新的生物材料和酶过程,它们能被用来开发生产对环境敏感的产品如工业材料、食品和医疗药物。事实上,细菌代谢的知识已经成为现代工业经济的一个可观部分的基础(见框 13-3)。

375

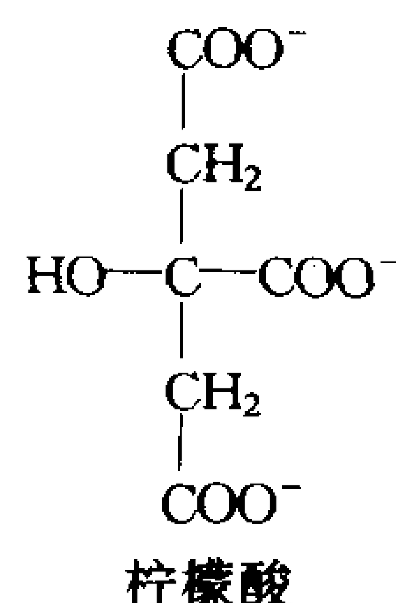
框 13-3　生物化学相关内容

细菌代谢的实际应用

开发微生物要追溯到古代的巴比伦人,他们七千多年前就已生产醋。从那时起,酵母菌由于对发酵、酿造和蒸馏工业的贡献在历史上赢得显著地位。然而到上个世纪,细菌在代谢产物的种类和经济重要性方面已超越了酵母菌。

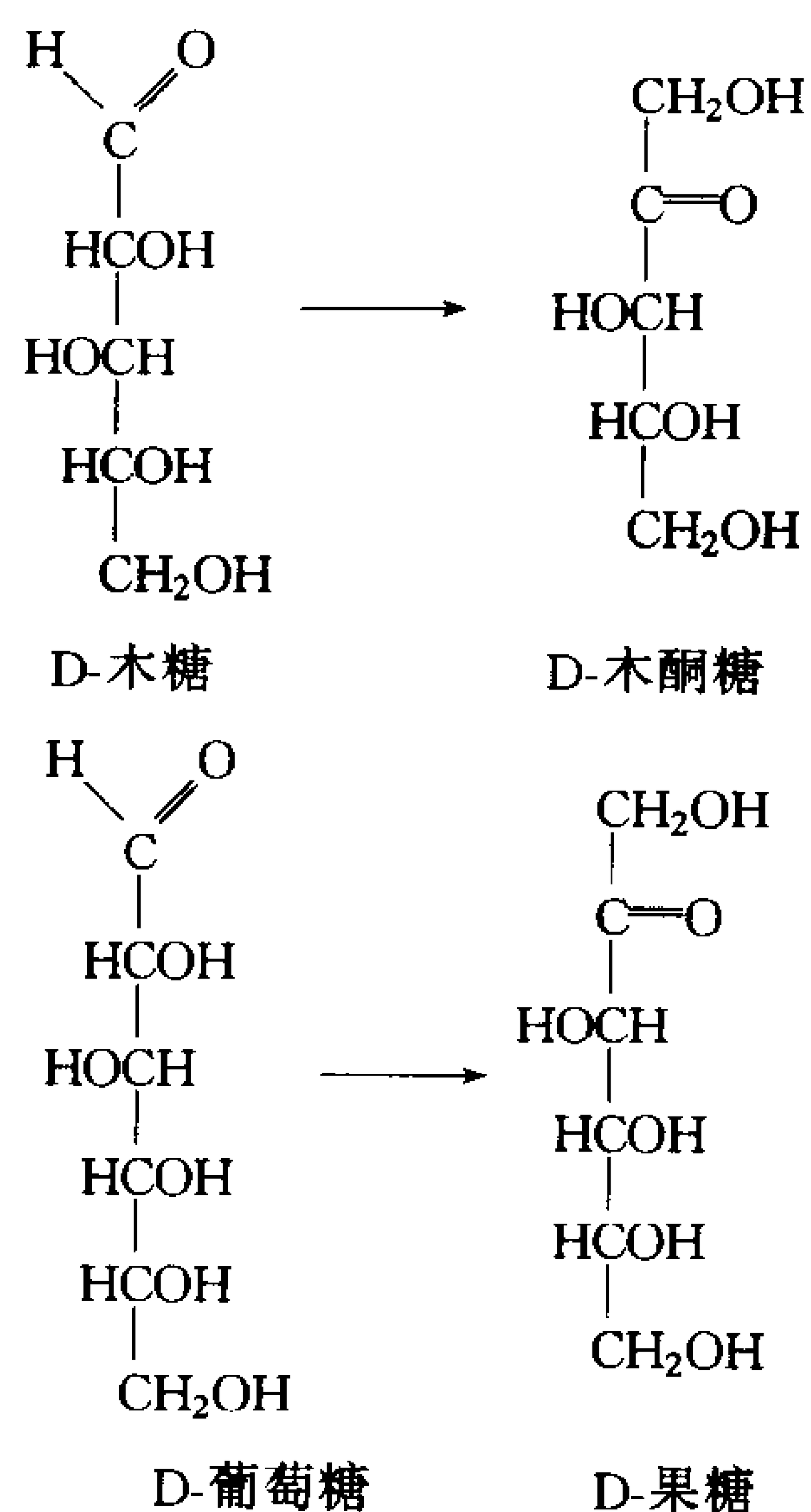
从牛奶生产酸奶取决于嗜热链球菌(*Streptococcus thermophilus*)和保加利亚乳杆菌(*Lactobacillus bulgaricus*)的活性。与之相似,干酪的制造则是各种细菌和真菌作用的结果。细菌代谢的特殊产物,能从培养液或溶解的细胞纯化,包括一些抗生素和抗癌剂。许多这些化合物原先是从海洋生物纯化的,后来发现是它们的细菌共生体的代谢物。香草醛和其他的香料,例如苯甲醛(樱桃香)和由短链脂肪酸衍生的甲基酮(干酪和水果香)由细菌生产,并易于纯化,而且没有从植物来源纯化时伴随的那些副产物(有时是毒性的)。

用微生物大规模生产工业化学制品降低了对昂贵的不可靠的蔬菜或矿物原料的依赖。例如 Chaim Weizmann 发现丙酮和丁醇能从丙酮丁醇梭菌(*clostridium acetobutylicum*)培养物中获得,第一次世界大战时中断了这些化学制品的供应。利用真菌黑曲霉(*Aspergillus niger*)从葡萄糖生产**柠檬酸**(citric acid)始于 1923 年,把化学工业从不断变动的柑橘类水果供应中拯救出来。



柠檬酸

细菌的酶本身在经济上也是重要的。例如一个普通的甜味剂果糖可以从葡萄糖经过短杆菌(*Bacillus*)的**木糖异构酶**(xyloseisomerase)的作用生产，该酶的生理功能是转变木糖成木酮糖，但其特异性扩大到葡萄糖：



细菌的淀粉酶用于生产纸，细菌的蛋白酶用于制革，而加到洗衣剂中则能降解蛋白质污渍。动物和人来源的许多蛋白质正在用遗传工程转化的细菌来培养生产(节 3-5)。

利用细菌代谢中过程比产物更重要的一个极好的例子是污水中有机物质的降解。一个城市污水处理过程典型地从可溶化合物的需氧氧化开始，随之进行不溶物质的厌氧降解。由于厌氧消化产物常常是不完全氧化的，该物质必须重新通气，用好气细菌将其进一步降解成 CO_2 和 H_2O。作为"处理"污水的生物是典型的混合物。

某些有机体在一起有效地消化制造纸、食用油和其他产物时产生的废物，因而使某些潜在的毒性化合物变成无害。有些细菌积累重金属，将它们浓缩以致达到菌体干重的 30%。这些"解毒"细菌明显地用来拯救污染的土壤，如利用烃类的菌可用来处理溢出的油污。

细菌和藻类能利用农业或工业废物旺盛地生长，使得它们成为一种廉价的营养生物量的资源，收集它们来补充家畜或鱼的饲料。蛋白质可以高达细胞干重的 70%，在这一点上，一英亩池塘的藻类是一英亩普通农作物产量的 10 到 50 倍。

细菌代谢的许多潜在的应用仍未被了解。例如从理论上看，可能使用重组 DNA 技术来改变细菌的酶，以改善稳定性、拓宽底物特异性或加速催化作用，用作引导已知结构的同源蛋白质。已具有改进了的酶的有机体在生产特定的代谢物时可能胜过野生型的生物。代谢工程——来自其他有机体的单个的酶或不完全途径在单个有机体里组合成新的代谢途径，能引导出全新的工业。

早先的代谢研究使用整个有机体，常常是酵母菌，但也有哺乳动物。例如 Frederick Banting 和 Charles Best 于 1921 年建立了胰脏在糖尿病中的作用；他们用手术去掉狗的胰脏，然后观察患该病的狗。从那时起研究代谢过程的技术更为精巧，从整个器官制剂和薄组织切片进步到培养细胞和用超速离心分离细胞器(节 5-2E)。

A. 追踪代谢结局

代谢途径中一个化合物转变成另一个化合物，故能用一个特别标记的代谢物来追踪。在1904 年，Franz Knoop 设计这种技术来研究脂肪酸氧化，他用化学标记了苯基的脂肪酸喂狗，并从狗尿中分离苯基置换的终产物。根据苯基置换的起始物质是奇数还是偶数碳原子，从其产物的不同，Knoop 推断脂肪酸是以二碳单位降解的（节 19-2）。

化学标记的缺点是标记化谢物的化学性质与正常的代谢物不同，用同位素标记的分子会解决这个难题。*代谢物中一个被同位素标记的原子的去处随其通过有关代谢途径而得以阐明。*因此，20 世纪 40 年代同位素标记和示踪技术的问世引起了代谢研究的革命。

使用同位素示踪物对代谢理解的早期进展之一是 David Shemin 和 David Rittenberg 在 1945 年的论证，即血红素（图 7-2）的氮原子是来自甘氨酸而非氨、谷氨酸、脯氨酸或亮氨酸（节 20-6A）。他们将这些 ^{15}N 标记的营养物喂鼠，从鼠血中分离血红素并分析其中 ^{15}N 含量。只有用 [^{15}N]甘氨酸饲喂的鼠的血红素含 ^{15}N。这种技术也被用来论证胆固醇的所有碳原子是乙酰-CoA 衍生的（节 19-7A）。放射性同位素（框 12-1）对确定复杂代谢物的代谢起源几乎是绝对必要的。

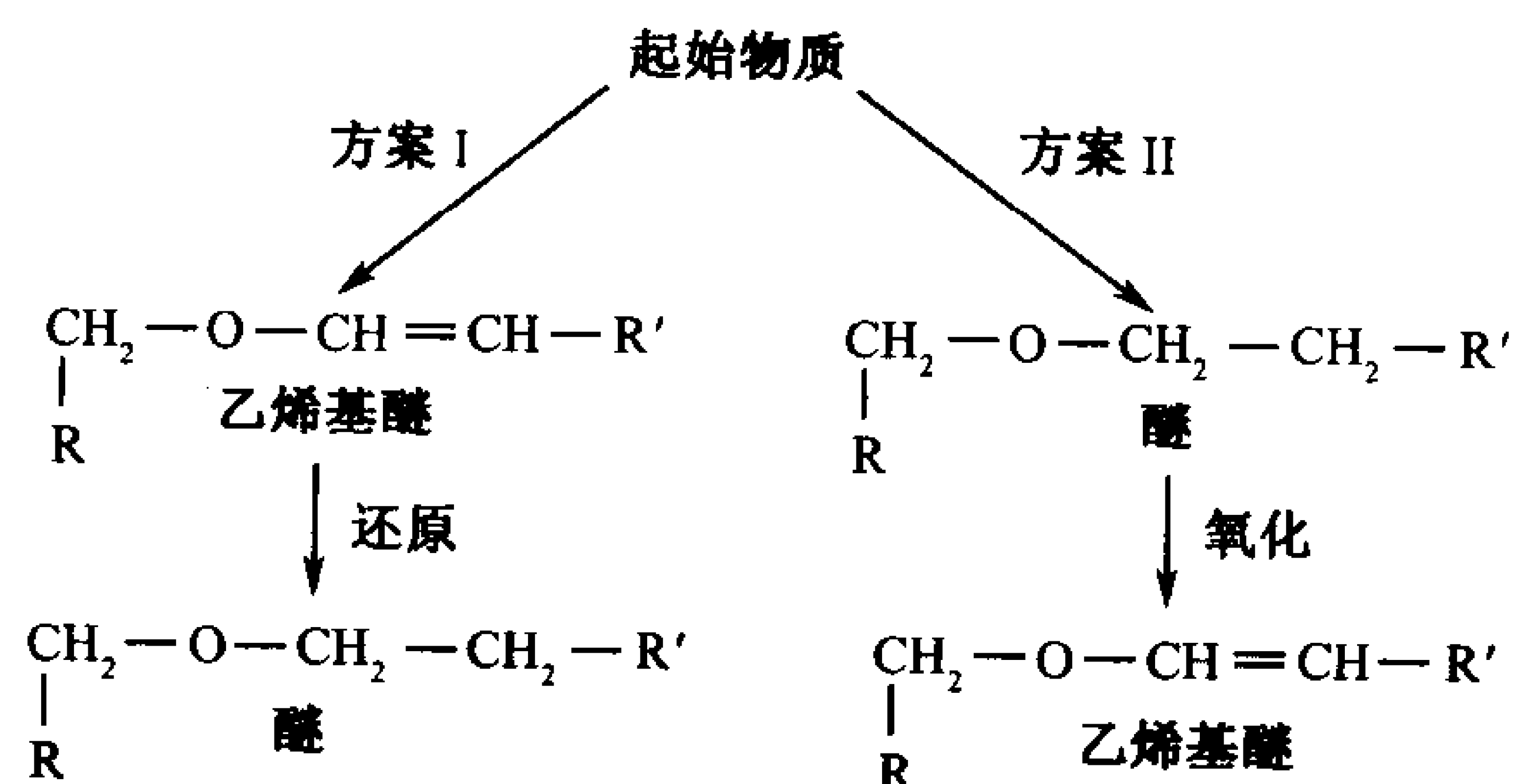
追踪标记代谢物命运的另一方法是核磁共振（NMR），它测定特殊同位素，包括 ^{1}H、^{3}C、^{15}N 和 ^{31}P 的特征核自旋。因为一个特别核的 NMR 谱随其最接近的环境而改变，这就可能甚至在相当复杂的混合物中鉴定相应于特殊原子的峰。磁铁的发展大到足以适于动物和人并让谱局限于特殊器官时使得用 NMR 非侵害性地研究代谢途径成为可能。例如，通过监测像 ATP、ADP 和磷酸肌酸那样的磷酸化合物的水平，^{31}P NMR 能用来研究肌肉里的能量代谢。

用 ^{13}C（其天然丰度仅 1.10%）同位素标记代谢物的特殊原子使得标记原子的代谢进程能用 ^{13}C NMR 追踪。图 13-13 是鼠肝注射 D-[1 − ^{13}C]葡萄糖前后活体的 ^{13}C NMR 图谱，可以看到 ^{13}C 进入肝脏，再结合成糖原（葡萄糖的贮存形式，节 15-2）。　377

同位素示踪物能建立前体-产物关系

要确定一个代谢物转变成另一个代谢物的化学转化顺序有时是困难的，在研究文献上依然偶尔出现矛盾的方案。考虑一下缩醛磷脂（节 9-1C）和**烷基酰基甘油磷脂**（alkylacylglycerophospholipid）（节 19-6A）的生物合成。烷基酰基甘油磷脂是醚，而密切相关的缩醛磷脂是乙烯基醚，它们的类似结构引起对它们生物合成关系的有趣问题：谁是前体，谁是产物？两种可能的合成模式想来是：　378

在方案 I 中，起始物质转变成乙烯基醚（缩醛磷脂），然后再还原成醚（烷基酰基甘油磷脂），因此乙烯基醚是前体，醚是产物。在方案 II 中，首先形成醚，再氧化成乙烯基醚，醚是前体，乙烯



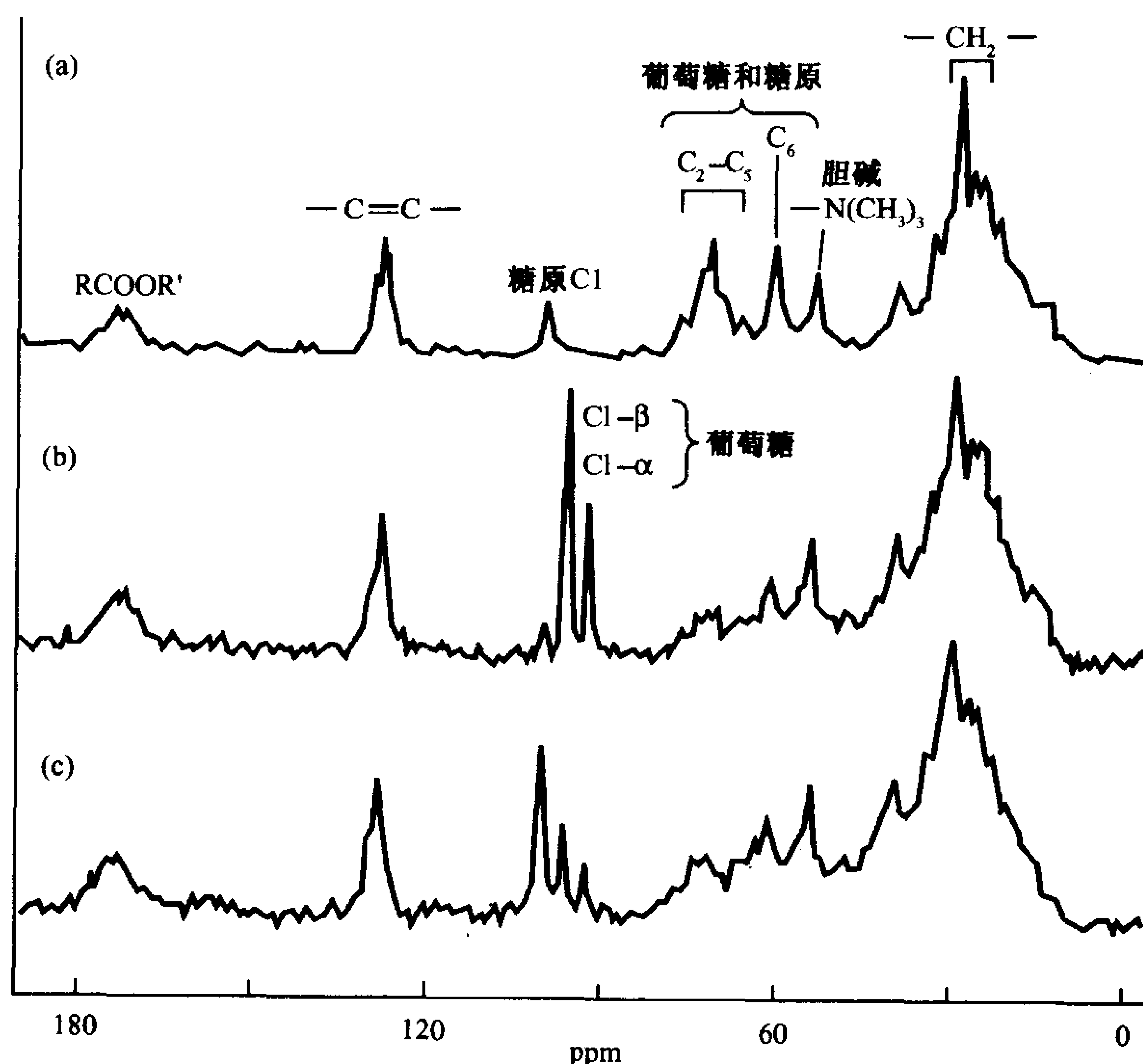
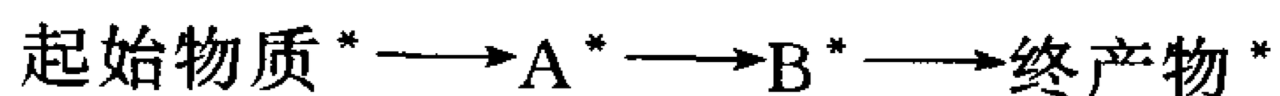


图 13-13　定位活体^{13}C NMR 观察[1 - ^{13}C]葡萄糖转变成糖原

(a)活鼠肝脏天然丰度的^{13}C NMR 图谱。注意相应于糖原 C1 的共振。(b)同一只鼠在静脉注射 100mg[1-^{13}C]葡萄(90%加浓的)约 5 分钟后肝脏的^{13}C NMR 图谱。葡萄糖的 α 和 β 异头物的 C1 原子的共振彼此明显不同,并有别于糖原 C1 原子的共振。(c)同一只鼠注射[1-^{13}C]葡萄糖的 30 分钟后肝脏的^{13}C NMR 图谱。葡萄糖的 α 和 β 异头物的 C1 共振大为降低,而糖原的 C1 共振增加。[引自 Reo, N. V. Siegfrid, B. A. and Acherman, J. J. H, J. Biol Chem. 259, 13665(1984)]

基醚为产物。

通过使用**放射性示踪物**(radioactive tracer)能极容易理出前体-产物的关系:少量标记的起始物质以脉冲的形式给予生物,然后转变成标记的产物:



$$\text{起始物质}^* \longrightarrow A^* \longrightarrow B^* \longrightarrow \text{终产物}^*$$

(此外 * 代表放射性标记)。全程监测产物的比放射性。

通常,一条代谢途径是在一种稳定状态下运作的;亦即,在反应的每一步,代谢物的产量是相等的。此外,大多数代谢反应的速率对于一个给定的底物而言是一级反应。按这样的假设,B 的放射性[B*]的变化率等于从 A* 到 B* 的标记变化率减去从 B* 到该途径下一个产物的变化率。

$$\frac{d[B^*]}{dt} = k[A^*] - k[B^*] = k([A^*] - [B^*]) \qquad [13\text{-}11]$$

此处 k 是对于 A 转变到 B 和 B 转变到它的产物的假一级速率常数,而 t 是时间。检查这个方程提出了必须适于建立 A 是 B 的前体的判据(图 13-14):

1) 当产物的放射性升高时($d[B^*]/dt > 0$),其值比前体的要小($[A^*] > [B^*]$)。

2) 当产物的放射性在其峰值($d[B^*]/dt = 0$)时,与其前体的值相等($[A^*] = [B^*]$),这也

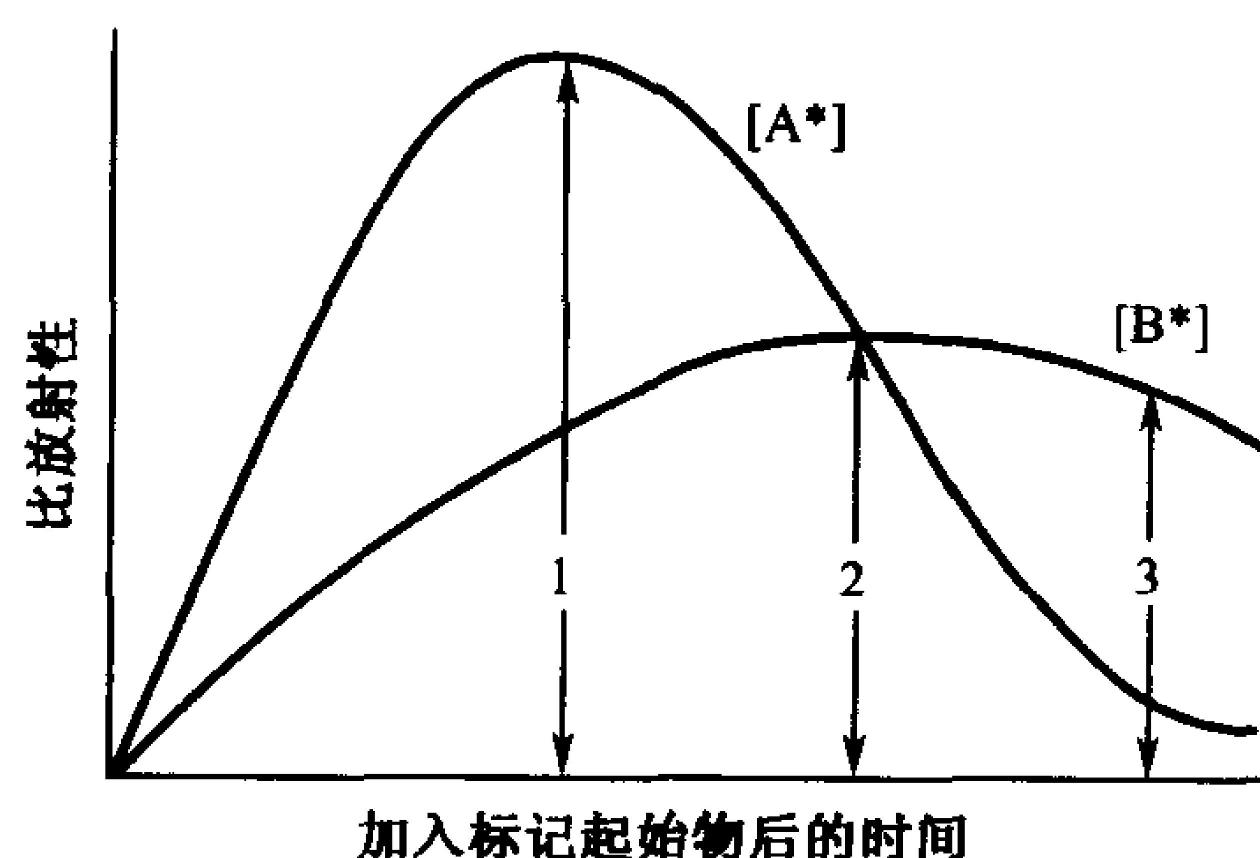


图 13-14　从前体到产物放射性脉冲的流动

在点 1，产物(B^*，紫色)的放射性增加但小于前体(A^*，橙色)的放射性；在点 2，产物的放射性最大，并且等于其前体的放射性；而在点 3，产物的放射性减小，但比前体的放射性大许多。

意味着产物放射性的峰值在其前体之后。

3) 在产物的放射性达到峰值之后($d[B^*]/dt<0$)，该值依然大于其前体。

使用^{14}C 标记的起始物质，阐明了烷基酰基甘油磷脂与缩醛磷脂之间前体与产物的关系：醚是前体而乙烯基醚是产物(方案 II)。

B. 扰乱体系

379

用来阐明代谢途径的中间物和酶的许多技术以以下某些方式扰乱体系，并观察如何影响该途径的活动。扰乱代谢途径的一个方法是加入某些称之为**代谢抑制剂症**(metabolic inhibitor)的物质，它们在特殊的位点阻断该途径，从而使其前面的中间物积累。这一方法阐明了酵母菌通过糖酵解将葡萄糖转变为乙醇(节 14-2B)。类似地，加入物质在不同的部位阻断电子转移可用来推论线粒体电子传递链中电子载体的顺序(节 17-2B)。

遗传缺陷也使代谢的中间物积累

20 世纪初 Archibald Garrod 理解到人的遗传疾病是缺失特殊酶的结果，这也可用来说明代谢途径。例如患有被称之为**尿黑酸尿症**(alcaptonuria)的无害遗传条件的人，但不是正常的人，注射苯丙氨酸或酪氨酸时，在他们的尿中排出**尿黑酸**(homogentisic acid)(框 20-1)。这是因为尿黑酸尿患者的肝脏中缺少催化尿黑酸分解的酶(图 13-15)。

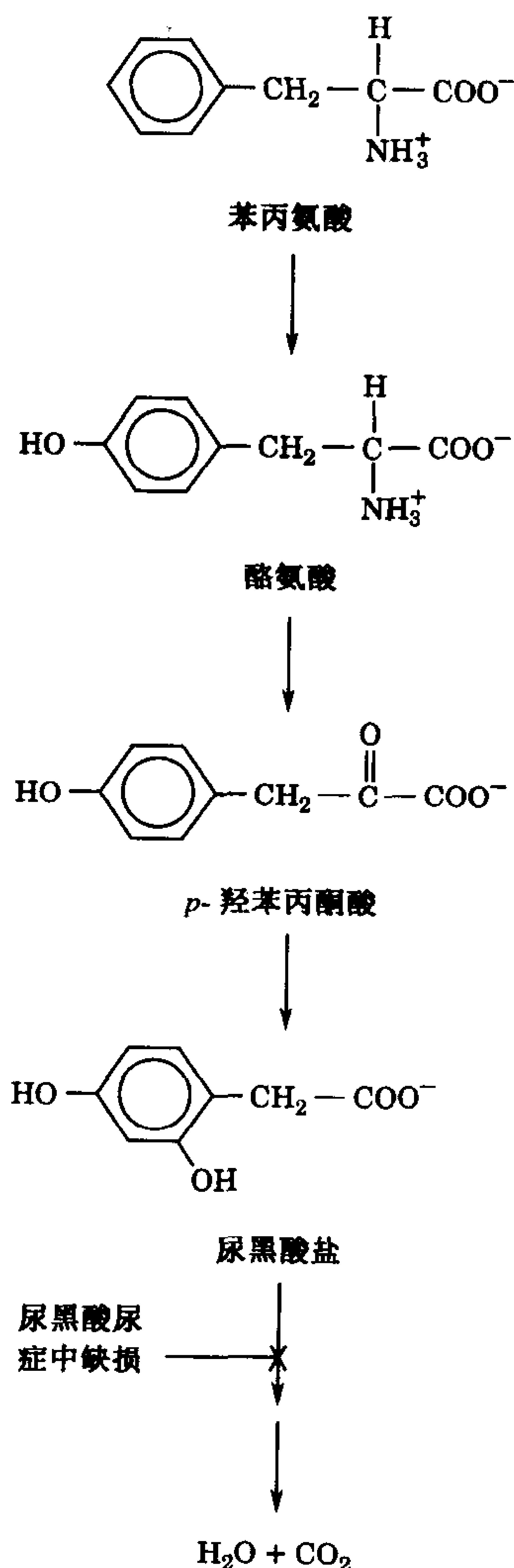


图 13-15　苯丙氨酸降解途径

尿黑酸尿患者缺少分解尿黑酸的酶，因此积累该中间物并排泄到尿中。

遗传操作改变代谢过程

早期代谢研究导致的惊人发现是*多数生物的主要代谢*

途径是基本相同的。这种代谢的同一性大大有利于代谢反应的研究。因此,虽然可能不知道高等生物中使感兴趣的代谢途径的一个酶失活或消除的变异,但是对于一个快速繁殖的微生物,通过使用**诱变剂**(mutagen)(诱导改变遗传的化学试剂,节 24-4A)、X 射线、或者更现代地通过遗传工程技术(节 3-5),能容易地产生变异。所想要的变异——不能合成该途径的终产物——能通过需要在其培养基中加入合成该产物所需要的物质来验证。

通过遗传工程使其缺失特殊基因(亦即基因"剔除")(节 3-5D)的高等生物是有用的,特别是缺乏一个简单的基因产物只造成一种代谢上的不足,而不是致命的那些情况。遗传工程技术已经进步到有可能选择性地只在一特定的组织中"剔除"一个基因的程度。这一方法在有些情况下是必须的,即一个基因产物为发育所需因而不能被完全消除掉。与之相反,构建转基因动物的技术使得有可能在组织中表达原本不存在的基因。

小　　结

1. 从分解氧化反应释放的自由能被用来驱动吸能的合成反应。
2. 异养生物是从无机化能营养生物或光合自养生物合成的化合物获得它们的自由能。
3. 系列反应形成代谢途径,它们在不同的细胞部位运作。
4. 近平衡反应是自由可逆的,然而远离平衡的反应是调节点,并使代谢途径变成不可逆。
5. 通过一条代谢途径的通量是通过调节催化其限速步骤的酶的活性来控制的。
6. "高能"化合物 ATP 的自由能通过裂解它的一个或两个磷酸酐键而被使用。
7. 一个像 ATP 或 PP_i 水解的放能反应能够与一个吸能反应偶联使其更有利于进行。
8. 底物水平磷酸化作用是 ADP 从另一化合物转移磷酰基合成 ATP。
9. 碳水化合物、脂类和蛋白质分解代谢的共同产物是乙酰 CoA,它是一个"高能"硫酯。
10. 辅酶 NAD^+ 和 FAD 在代谢物氧化时被可逆地还原。
11. Nernst 方程列出一个氧化还原的电动势与标准还原电位以及电子供体和受体的浓度之间的关系。
12. 电子从还原电位负值较大的化合物自发地流向正值较大的化合物。
13. 代谢途径的研究力图确定代谢转化的顺序、它们的酶的机制、它们的调节。以及它们与其他组织中代谢过程的关系。
14. 代谢途径的步骤能够通过使用同位素示踪物和检测代谢抑制剂的作用、自然变异以及遗传工程的改变来确定。

参 考 文 献

Goodridge, A.G., The new metabolism: molecular genetics in the analysis of metabolic regulation, *FASEB J.* **4**, 3099–3110 (1990).

Harold, F.M., *The Vital Force: A Study of Bioenergetics*, Chapters 1 and 2, Freeman (1986).

Jeffrey, F.M.H., Rajagopal, A., Malloy, C.R., and Sherry, A.D., ^{13}C-NMR: a simple yet comprehensive method for analysis of intermediary metabolism, *Trends Biochem. Sci.* **16**, 5–10 (1991).

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., and Frederickson, D.S. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (7th ed.), McGraw–Hill (1995). [Most chapters in this encyclopedic work include a review of a normal metabolic process that is disrupted by disease.]

Westheimer, F.H., Why nature chose phosphates, *Science* **235**, 1173–1178 (1987).

关　键　词

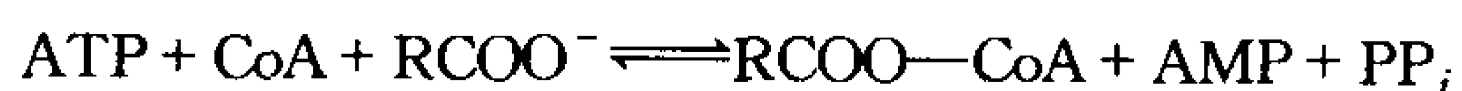
代谢　metabolism
分解代谢　catabolism
合成代谢　anabolism
自养生物　autotroph
无机化能营养生物　chemolithotroph
光合自养生物　photoautotroph
异养生物　heterotroph
需氧的　aerobic
厌氧的　anaerobic
代谢物　metabolite
同工酶　isozyme
近平衡反应　near-equilibrium reaction
底物循环　substrate cycle
“高能”中间物　“high-energy”intermediate
正磷酸裂解　orthophosphate cleavage
焦磷酸裂解　pyrophosphate cleavage
底物水平磷酸化(作用)　substrate-level phosphorylation
氧化磷酸化(作用)　oxidative phosphorylation
光合磷酸化(作用)　photophosphorylation
激酶　kinase
磷酸肌酸　phosphagen
还原剂　reducing agent
氧化剂　oxidizing agent
半反应　half-reaction
氧化还原对　conjngate redox pair
电化学池　electrochemical cell
法拉第常数　$\mathscr{F}$
Nernst 方程　Nernst equation
生化标准还原电位　$\mathscr{E}^{\circ\prime}$
放射性示踪物　radioactive tracer

学习思考题

1. 叙述自养生物和异养生物之间的不同。
2. 解释功能近于平衡的反应和功能远离平衡的反应的代谢意义。
3. 为什么 ATP 是一个“高能”化合物?
4. 叙述放能过程能驱动吸能过程的方式。
5. 还原型辅酶的代谢任务是什么?
6. 解释 Nernst 方程的条件。
7. $\Delta\mathscr{E}$ 与 ΔG 的关系如何?
8. 解释同位素标记的化合物如何能揭示前体与代谢的关系。

练　习　题

1. 假设能量保存效率为 100%,在标准状况下完全氧化(a)1 摩尔葡萄糖和(b)1 摩尔棕榈酸时合成多少摩尔的 ATP?
2. 当 pH 从 5 增加到 6, ATP 水解时自由能变化的量是增加还是减少?
3. 脂肪酸($RCOO^-$)活化的反应



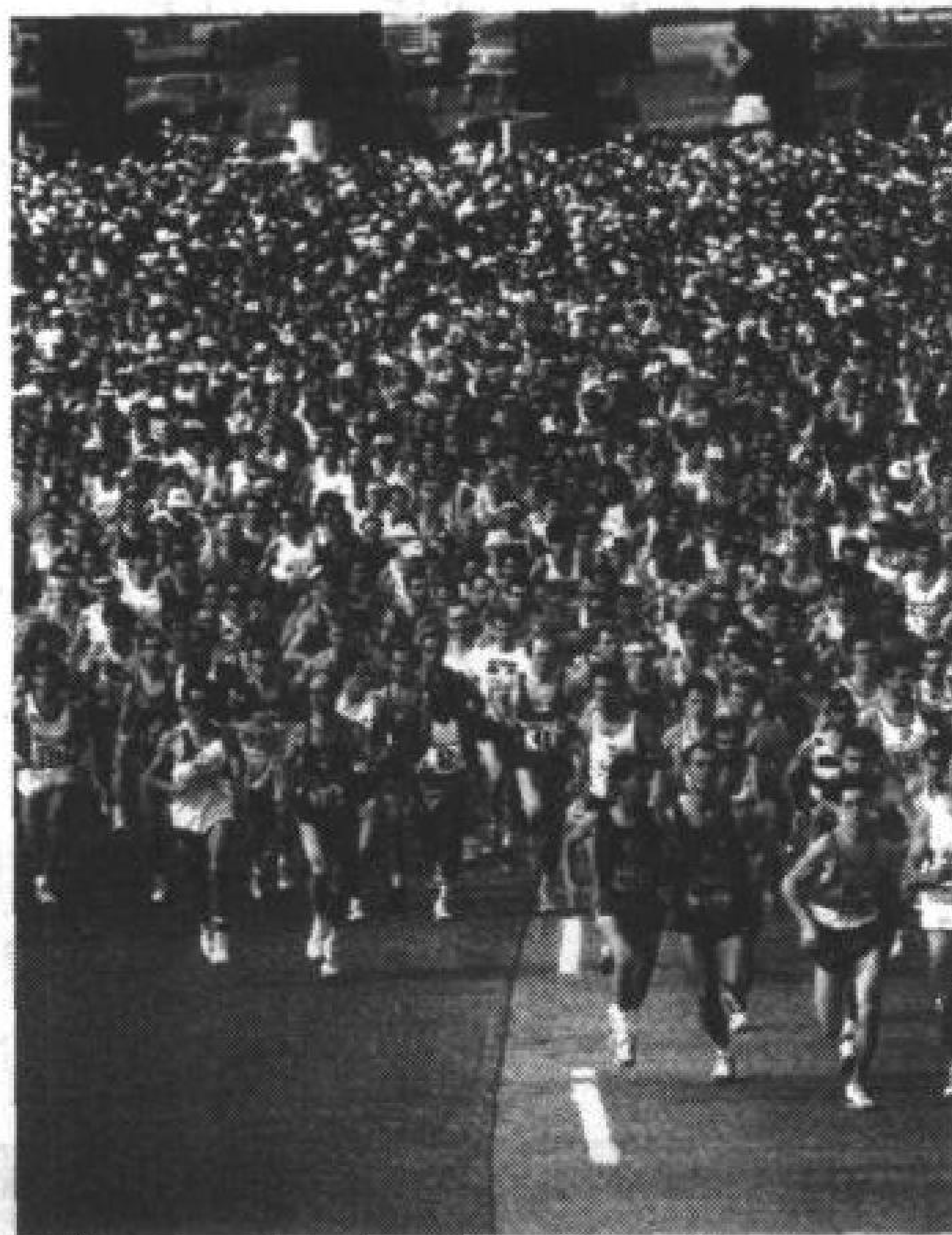
$$ATP + CoA + RCOO^- \rightleftharpoons RCOO—CoA + AMP + PP_i$$

其 $\Delta G^{\circ\prime} = +4.6\ kJ\cdot mol^{-1}$,进行该反应的热力学驱动力是什么?
4. 预测在 25℃, [ATP] = $4mmol\cdot L^{-1}$, [ADP] = $0.15mmol\cdot L^{-1}$, [磷酸肌酸] = $2.5mmol\cdot L^{-1}$以及[肌酸] = $1mmol\cdot L^{-1}$时,肌酸激酶反应将朝 ATP 合成的方向还是朝磷酸肌酸合成的方向进行。
5. 假如细胞内[ATP] = $5mmol\cdot L^{-1}$, [ADP] = $0.5mmol\cdot L^{-1}$以及[P_i] = $1.0mmol\cdot L^{-1}$,计算在腺苷酸激酶反应处于平衡时的条件下,在 pH 7 和 25℃ 时 AMP 的浓度。

6. 按氧化力降低列出以下物质的顺序:(a)乙酰乙酸;(b)细胞色素 $b(Fe^{3+})$;(c)NAD^+;(d)SO_4^{2-} 以及(e)丙酮酸。
7. 写出还原型泛醌被细胞色素 c 氧化的平衡方程,计算该反应的 $\Delta G^{\circ\prime}$和 $\Delta\xi^{\circ\prime}$。
8. 在标准状况下,下列反应将自发地如所写的那样进行吗?
   (a)富马酸 + NADH + $H^+ \rightleftharpoons$ 琥珀酸 + NAD^+
   (b)细胞色素 $a(Fe^{2+})$ + 细胞色素 $b(Fe^{3+}) \rightleftharpoons$ 细胞色素 $a(Fe^{3+})$ + 细胞色素 $b(Fe^{2+})$
9. 在标准状况下,游离的 $FADH_2$ 被泛醌氧化所释放能量是否足以驱动 ATP 的合成?
10. 一条假设的三步代谢途径由中间物 W、X、Y 和 Z 以及酶 A、B 和 C 组成,根据下面的资料演绎该途经中酶反应步骤的顺序:
   (1) 酶 B 的一个代谢抑制剂化合物 Q 使 Z 积累。
   (2) 酶 C 的一个突变体需要 Y 才能生长。
   (3) 酶 A 的一个抑制剂使 W、Y 以及 Z 积累。
   (4) 酶 C 的一个代谢抑制剂化合物 P 使 W 以及 Z 积累。

(清华大学 刘祖同 中科院微生物所 易祖华 译 郑昌学 校)

第 14 章　葡萄糖的分解代谢



代谢燃料(如葡萄糖)的燃烧是通过多步骤完成的,所以能量可以被保留并被利用以完成细胞的工作。训练有素的跑步者,葡萄糖被分送到其肌肉中去的效率特别高。(引自 Gamma Liaison)

383 利用酵母菌发酵葡萄糖(厌氧降解)产生乙醇和 CO_2,用于制造面包和酿酒已有好几个世纪了。然而科学地研究这一降解途径的化学,直到 19 世纪中叶才开始,这是基于巴斯德(Louis Pasteur)和其他人的实验。而完全搞清这一途径几乎花费了一个世纪,其间,此途径中的好几个重要方面得以揭示。

1) 1905 年,Arthur Harden 和 Williame Young 发现,磷酸是葡萄糖发酵所必需的。

2) 某些试剂,如碘乙酸和氟离子,可抑制此途径产物的生成,结果造成此途径中间产物的堆积。不同的底物生成不同的中间产物,从而发现分子间转变的顺序。

3) 研究不同生物是如何分解葡萄糖的,结果表明,除少数例外,所有生物都通过同样的途径。

经过许多研究者的努力,在 1940 年得到收获,葡萄糖降解的全部途径终于被阐明。这条途径被命名为**糖酵解**(glycolysis)[希腊语中:glykus(甜) + lysis(解开)],又被称为 **Embden-Meyerhof-Parnas 途径**,以纪念 Gustav Embden、Otto Meyerhof 和 Jacob Parnas 在阐明这一途径中所做的工作。

糖酵解可能是我们了解得最完全的生化途径,它包含 10 个酶反应。一分子葡萄糖转变为 2 分子三碳糖丙酮酸,伴随着产生 2 个 ATP。它在能量代谢中扮演着关键的角色,大多数生物所利用的自由能的很大一部分是由它提供的,在葡萄糖和其他化合物的进一步氧化降解中也需要 ATP,所以在我们讨论各种特殊的代谢途径之前必须先讨论糖酵解。我们将先探讨葡萄糖降解各反应的顺序,以及伴随的有关的酶的作用机制。然后再探讨影响糖酵解流量的特征,以及其产物的最终命运。最后我们还将讨论其他六碳糖的降解代谢和**磷酸戊糖途径**(pentose phosphate pathway),这是一条葡萄糖降解代谢的旁路,它的功能是提供生物合成的前体。

1. 糖酵解总览

在我们详细讨论糖酵解之前,先用一点时间浏览一下整个途径如何配合动物的整体代谢。通常出现在血液中的葡萄糖是由多糖(如肝糖原或膳食中的淀粉和糖原)分解,或者从非碳水化合物前体[**糖异生作用**(gluconeogenesis);见节 15-4]合成的。葡萄糖进入大多数细胞,是通过特殊的载体将它从细胞外转运入细胞质中(见节 10-4B)。糖酵解中的酶位于细胞质中,它们以松散的形式彼此结合,或者与其他细胞结构结合。

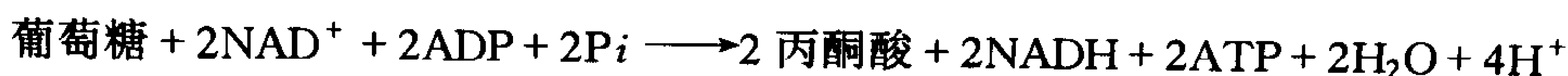
*糖酵解将葡萄糖转变为二个三碳单位(丙酮酸)。这一过程释出的自由能用于 ADP 和 P_i 合成 ATP。*所以糖酵解是一条与磷酸化反应偶联的化学途径(见节 13-2B)。糖酵解的 10 步反应见图 14-1。

请注意,在此途径的早期合成磷酸化合物(反应 1 和 3)时用去了 ATP,但以后又加倍再合成 385 ATP(反应 7 和 10),因此糖酵解可以分成二个阶段。

阶段 1:能量的投入(反应 1～5)。在此预备阶段,己糖葡萄糖被磷酸化,然后断裂生成二分子的**丙糖甘油醛-3-磷酸**,这个过程消耗了二个 ATP。

阶段 2:能量的回收(反应 6～10)。2 分子的甘油醛-3-磷酸转变为丙酮酸,伴随着产生 4 分子 ATP。因此糖酵解每分子葡萄糖有 2 个 ATP 的净收益:阶段 1 消耗 2 个 ATP;阶段 2 产生 4 个 ATP。

磷酸化基团一开始从 ATP 转到己糖上,并不立即得到“高能化合物”。然而,随后通过酶的转化将这些“低能量”产物转变为具有高转移势能的磷酸化基团,它们能够把 ADP 磷酸化为 ATP 的形式。整个反应为:



$$葡萄糖 + 2NAD^+ + 2ADP + 2P_i \longrightarrow 2\ 丙酮酸 + 2NADH + 2ATP + 2H_2O + 4H^+$$

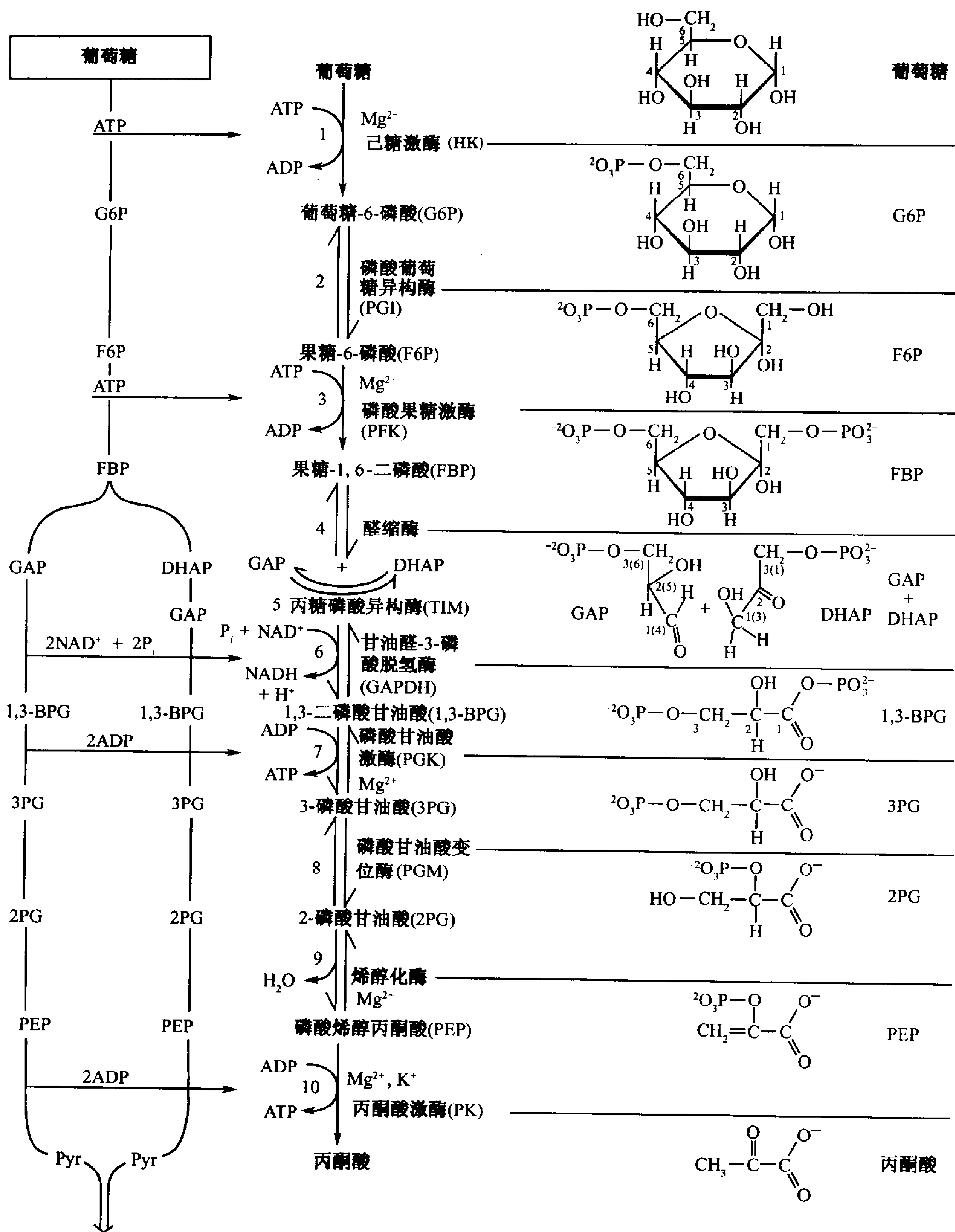


图 14-1　代谢的秘诀：糖酵解

在它的第一阶段(反应 1～5)，一分子葡萄糖经一系列反应消耗 2 个 ATP 被转变成为二分子甘油醛-3-磷酸。在糖酵解的第二阶段(反应 6～10)，二分子甘油醛-3-磷酸转变成二分子丙酮酸，产生 4 个 ATP 和 2 个 NADH。

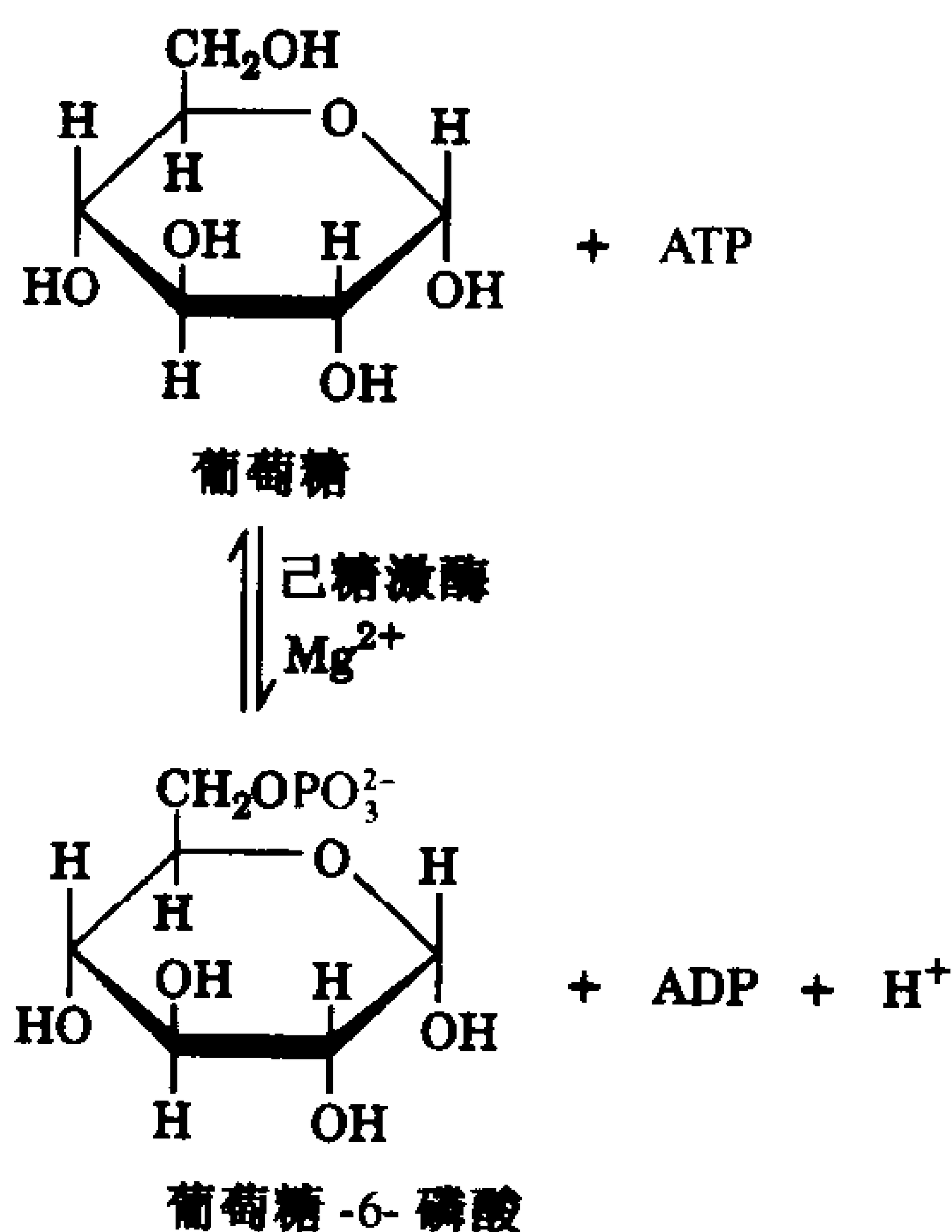
因此 NADH 在此过程中必须继续被再氧化，以保持提供此途径所需的最初的 NAD^+。在节 14-3 中我们将看到生物体是如何在有氧或无氧状况下完成这一过程的。

2. 糖酵解反应

在这一节中我们将更密切地审视糖酵解，论述每种酶的性质和它们的作用机制，当我们研究糖酵解过程中每一步的酶时，我们会遇到许多在节 11-3 中已描述过的催化机制。

A. 己糖激酶：ATP 的第一次利用

糖酵解的反应 1 是将一个 ATP 上的磷酸基团转移到葡萄糖上，形成**葡萄糖-6-磷酸(G6P)**，这是一个为**己糖激酶**所催化的反应，见左边。



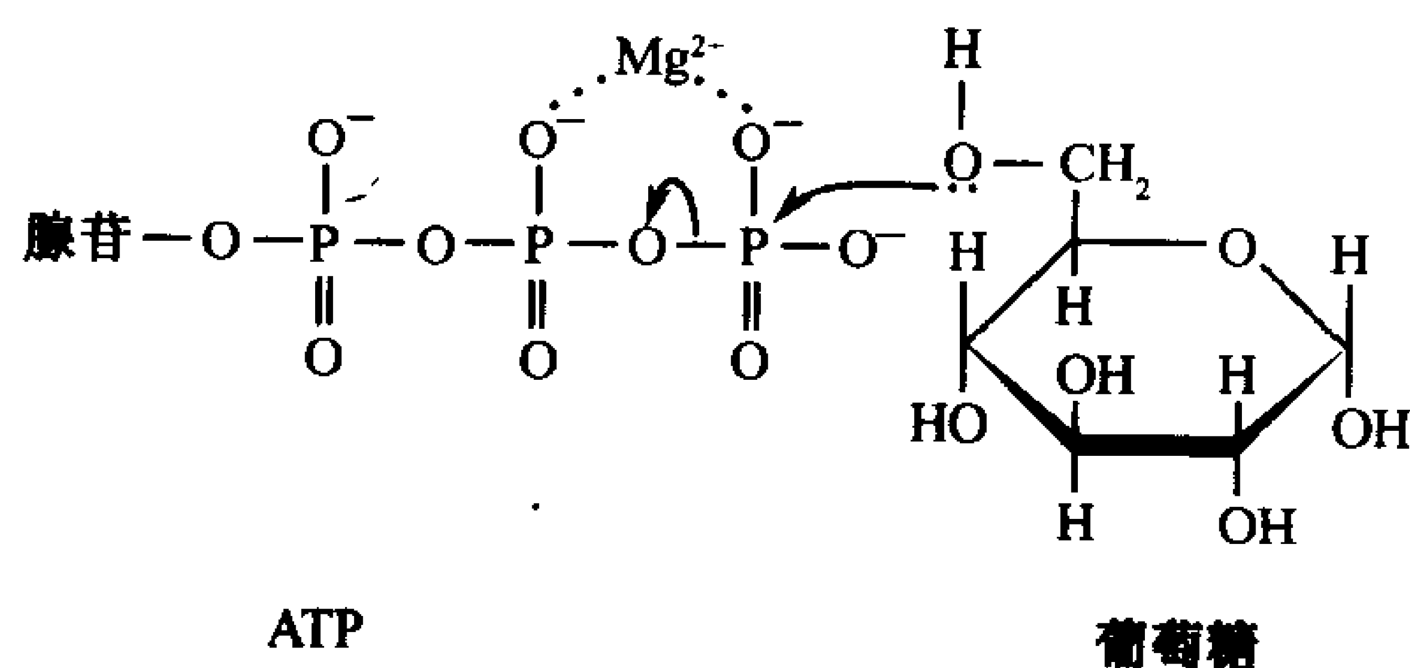
386

激酶是一种在 ATP 和代谢物(见节 13-2C)之间转移磷酸化基团的酶，作为磷酸化基团受体的代谢物，被标示在激酶名字的前缀中。己糖激酶是普遍存在的，相对来说是非专一的酶，它可以催化多种己糖的磷酸化，如 D-葡萄糖、D-甘露糖和 D-果糖。肝细胞也含有一个**葡萄糖激酶**(glucokinase)，它催化同样的反应，但首先是为了维持血液中葡萄糖的水平(见节 21-1D)。

己糖激酶的第二底物和其他激酶一样，是一个 Mg^{2+}-ATP复合物。事实上未被复合的 ATP 是己糖激酶的一个强有力的竞争性抑制剂，虽然我们并不常常明确地提到 Mg^{2+} 的参与，但它是激酶活性所必需的。Mg^{2+} 屏蔽 ATP 的 α 和 β 或 β 和 γ 磷酸上的氧原子的负电荷，导致 γ 磷原子更加容易受到葡萄糖上 C6—OH 基团的亲核性攻击。

将酵母己糖激酶的 X 射线结构和葡萄糖-己糖激酶复合物的结构进行比较，结果表明*葡萄糖可诱导己糖激酶的构象发生很大的改变*(图 14-2)。酶的两个叶片形成它的活性中心裂隙，当有葡萄糖存在时，两叶片摆动 8Å 而靠拢，以上下颌关闭的方式吞没葡萄糖，*这一运动使 ATP 非常接近葡萄糖的*—$C6H_2OH$ *基团，并将水从活性中心中排出(邻近效应催化*；节 11-3E)。如果催化基团和反应基团处在合适的反应位置，而酶处于开启的构象状态(图 14-2a)，ATP 的水解(亦即磷酸化基团转移到水分子上，这在热力学上是有利的)将肯定是主要的反应。

很清楚，底物诱导的己糖激酶构象变化形成酶的专一性。此外，水被排出导致活性中心的极性降低，从而加速了亲核反应过程，其他激酶具有和己糖激酶同样的深裂隙结构，与它们的底物结合后(例如腺苷酸激酶；图 13-8)也有构象改变。



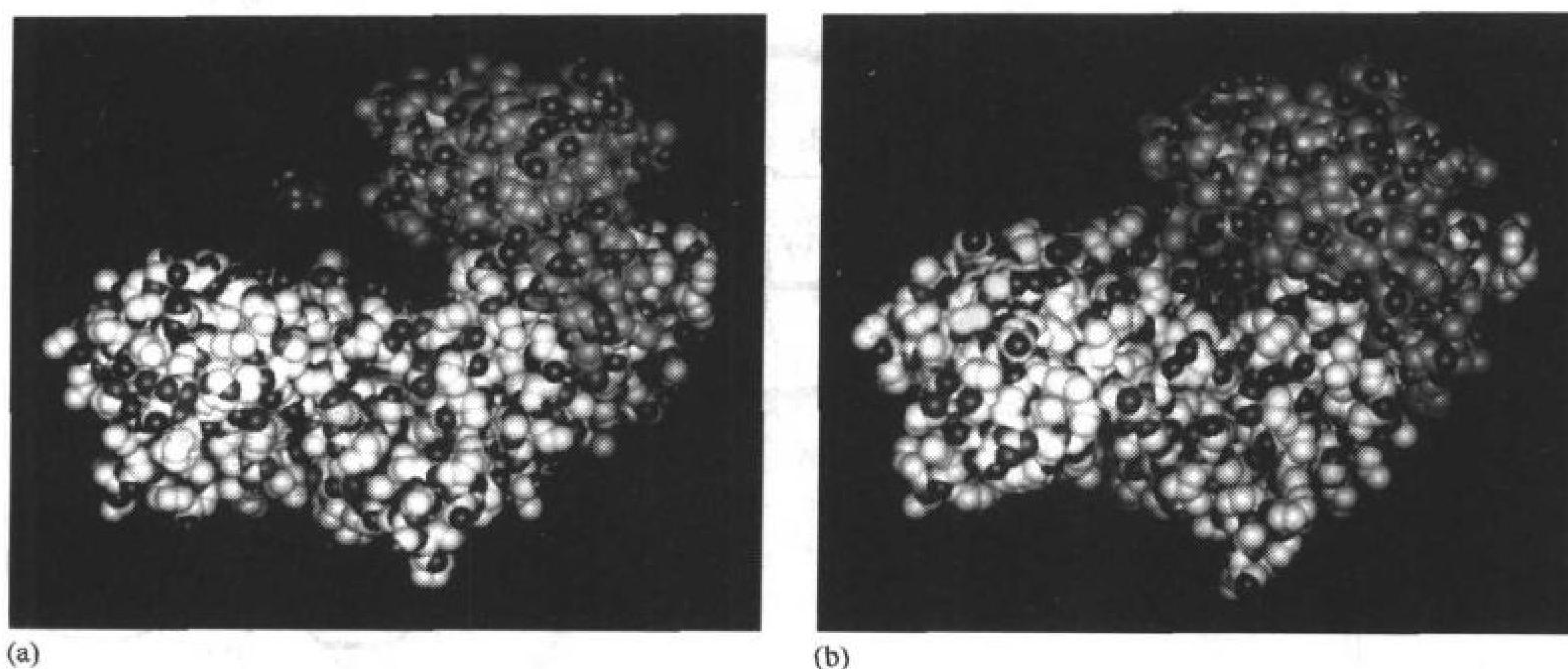


图 14-2　酵母己糖激酶在底物诱导下的构象变化

(a)己糖激酶亚基的空间填充模型，显示游离酶的双叶片形状(在小叶片上的碳原子以绿色表示，大叶片上的以浅灰色表示。氮和氧原子为蓝色和红色。(b)己糖激酶和葡萄糖(洋红色)复合物的模型。两叶片合在一起，吞没了底物。(引自 Thomas Steitz 的 X 射线结构，耶鲁大学)

B. 磷酸葡萄糖异构酶

387

糖酵解的第 2 步反应是通过**磷酸葡萄糖异构酶(PGI**；见右下图)将 G6P 转变为**果糖-6-磷酸(F6P)**，这是一个将醛糖异构化为酮糖的反应。

由于 G6P 和 F6P 主要以它们的环状形式存在，所以反应需要开环，异构化后再闭环(己糖的环式和线性形式的相互转变见图 8-3)。

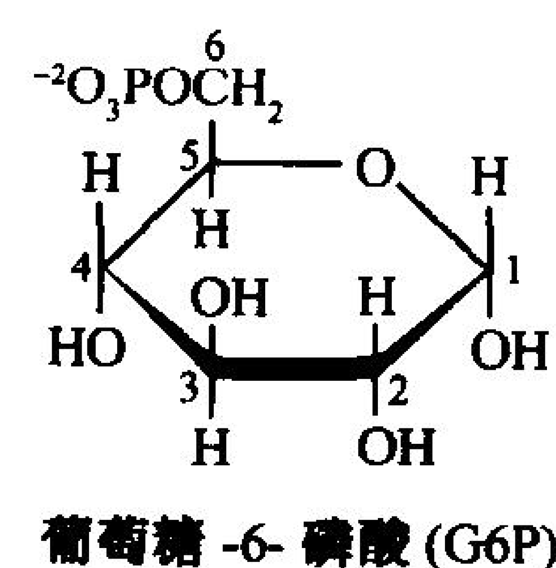
推测的 PGI 反应机制包含了酶催化的一般酸-碱反应(图 14-3)：

步骤 1：与底物结合。

步骤 2：酶上的酸，可能是保守的 Lys 残基上的 ε 氨基，催化环的打开。

步骤 3：一个碱基，猜想可能是保守的 Glu 残基上的羧酸基团，将酸性质子从 C2 上摘取形成一个顺式烯醇二酸中间物(此质子是酸性的，因为它是羰基的 α 位的)。

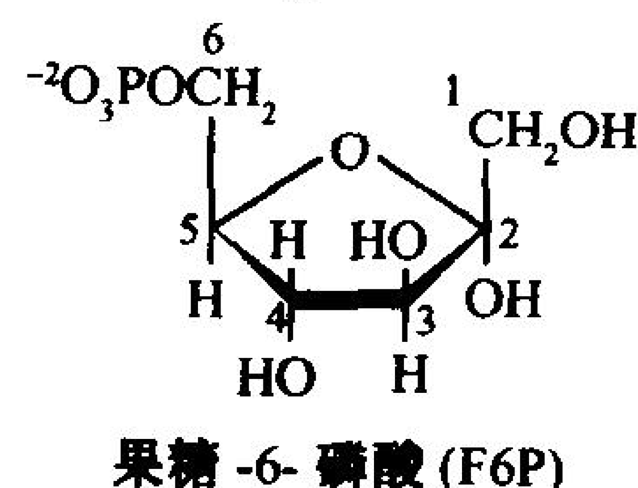
步骤 4：质子在转移过程中被移至 C1 上去，质子被碱吸引并很快与溶剂中的质子交换。Irwin Rose 根据 2-[^{3}H]G6P 有时通过分子内的质子转移可转变为 1-[^{3}H]F6P 而对这一步加以确认，这一过程在^{3}H 有机会与介质中的质子发生交换之前就已经完成了。



葡萄糖-6-磷酸 (G6P)

磷酸葡萄糖异构酶 (PGI)

388



果糖-6-磷酸 (F6P)

步骤 5：闭环形成产物，释放后又得到游离的酶，从而完成了催化循环。

C. 磷酸果糖激酶：ATP 的第二次利用

在糖酵解的反应 3 中，**磷酸果糖激酶**(PFK)使 F6P 磷酸化生成**果糖-1，6-二磷酸**(FBP 或 F1，6P，见下页图)。(产物是一个双磷酸而不是二磷酸，因为它的两个磷酸基团并不是相互直接

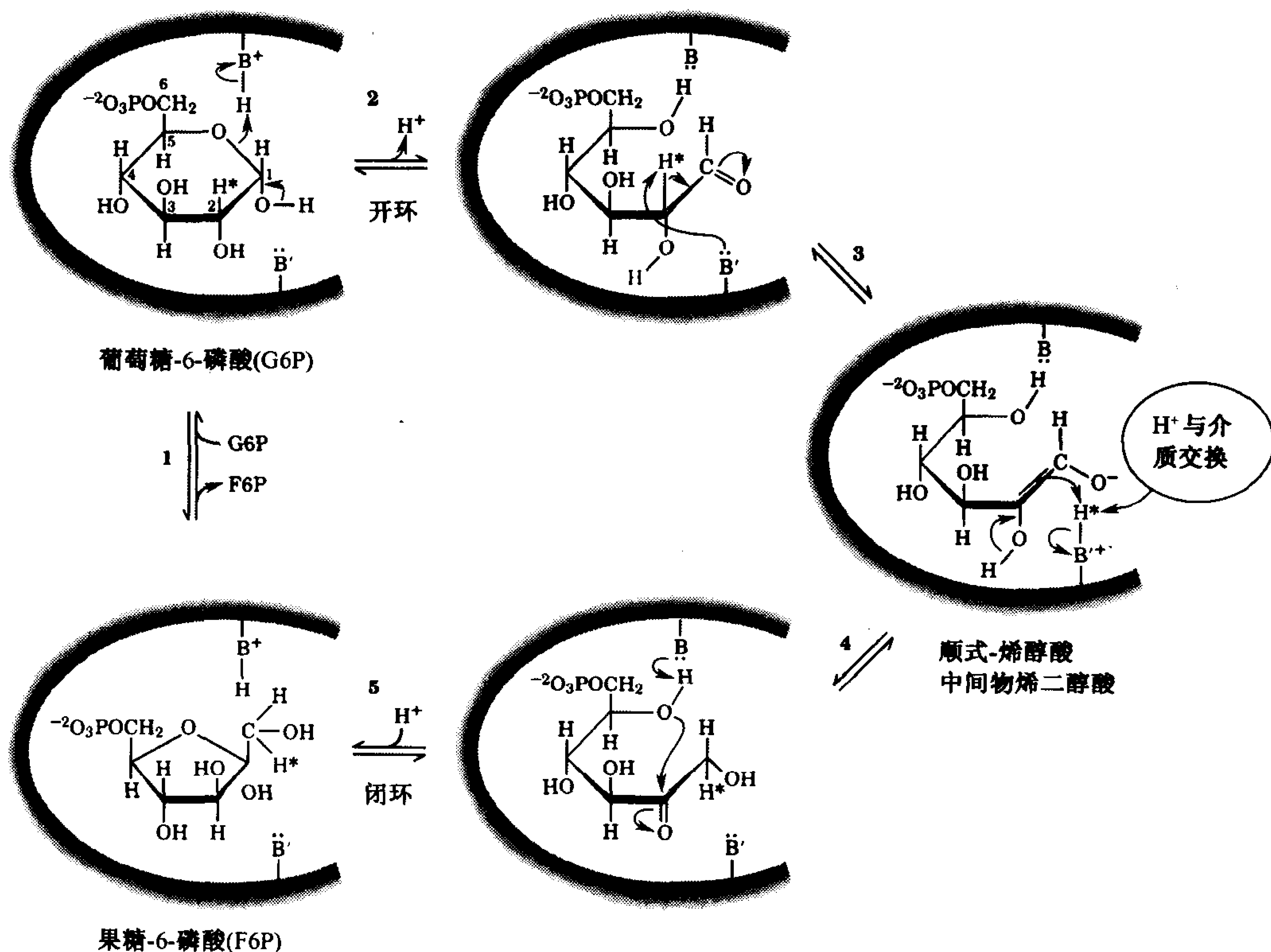
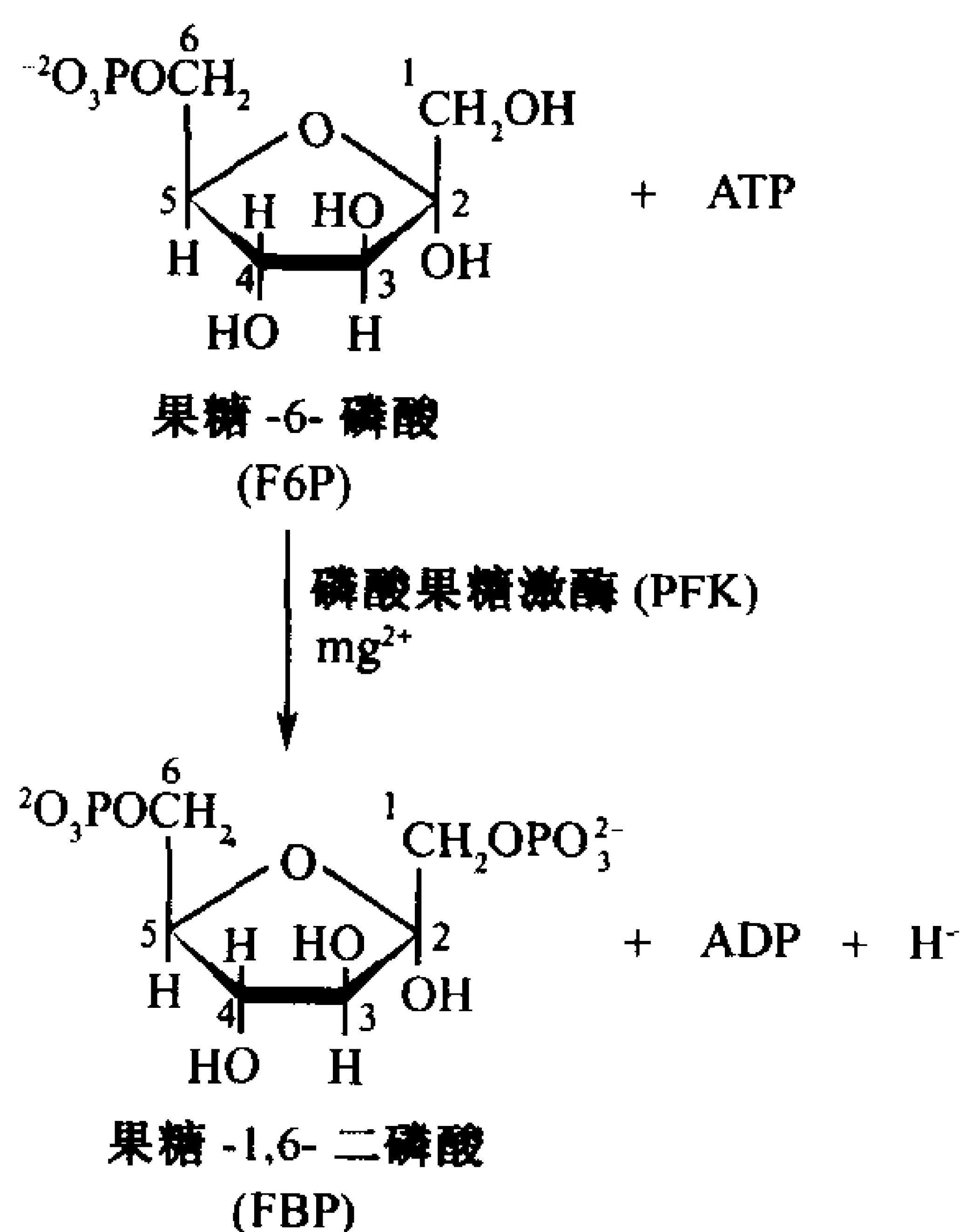


图 14-3 磷酸葡萄糖异构酶的作用机制

活性中心的催化残基，BH^+和B′猜想可能分别是Lys和Glu。



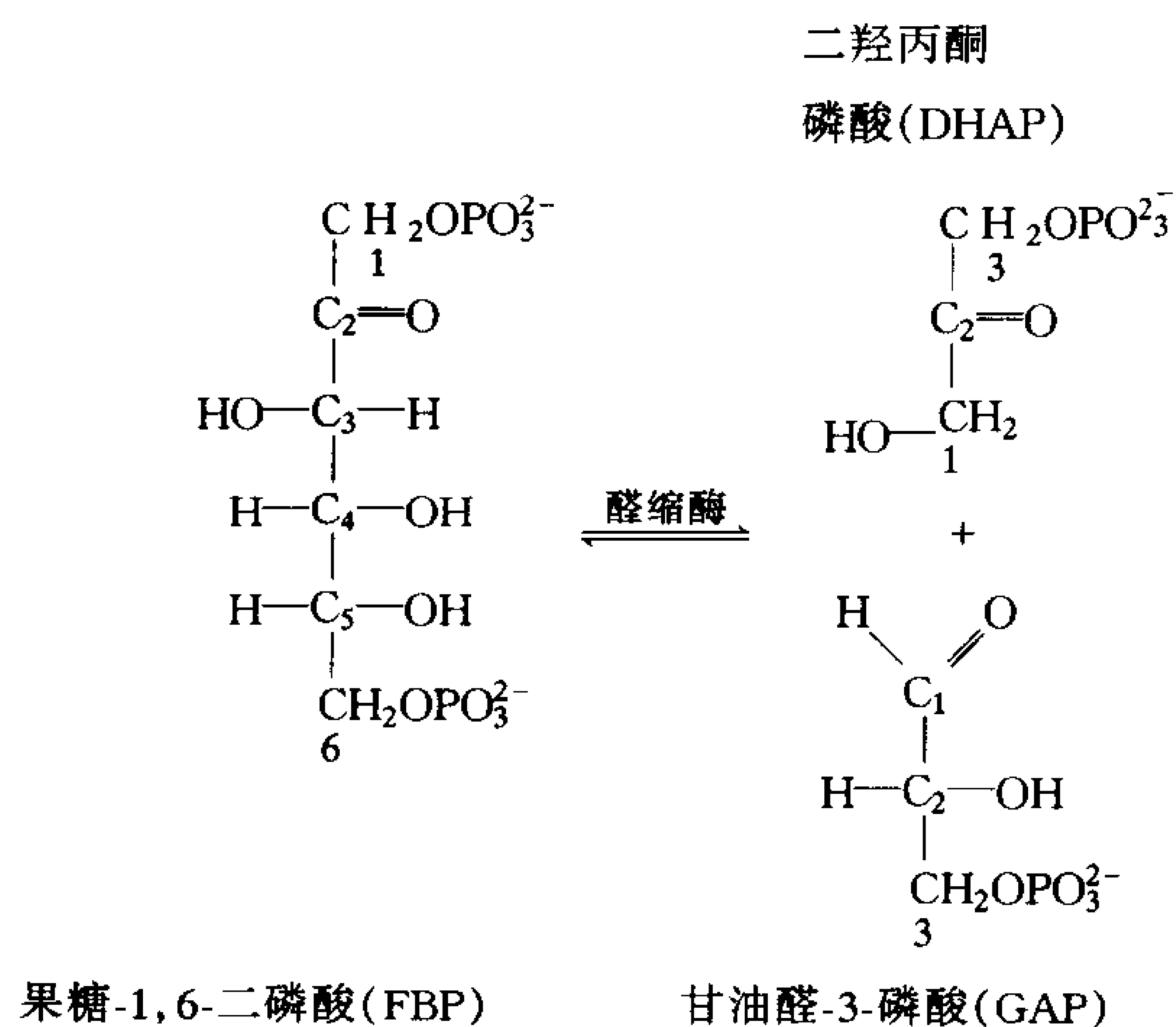
连接的。)

PFK反应与已糖激酶反应很相似。此酶催化F6P的C1-OH基团对Mg^{2+}-ATP复合物的亲电子γ-磷原子的亲核攻击。

*磷酸果糖激酶在糖酵解中扮演一个中心角色，因为它催化的是一个决定代谢途径速度的反应。*在许多生物体中，PFK当与几种物质，包括AMP在内，发生别构效应时活性是增强的，而某些其他物质，包括ATP和柠檬酸，则抑制别构效应，PFK的调控性质见节14-4A。

D. 醛缩酶

醛缩酶(aldolase)催化糖酵解的反应4，使FBP断裂生成二个丙糖：**甘油醛-3-磷酸**(GAP)和**二羟丙酮磷酸**(DHAP)。



请注意途径中的这一步，在这里原子的计数系统发生了改变，葡萄糖的第1、2、3原子变成了DHAP的第3、2、1原子，因此次序发生了颠倒。原子4、5、6变为GAP的原子1、2和3。

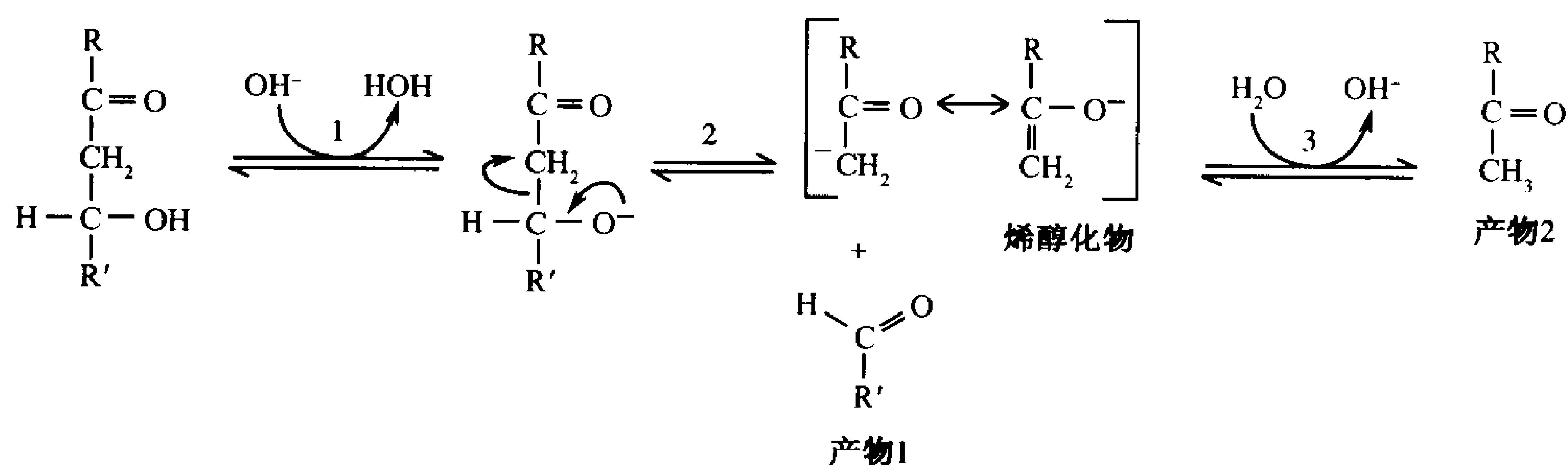


图 14-4　碱基催化的醛醇断裂机制
醛醇缩合反应则是逆向的机制。

反应4是一个**醛醇缩合断裂反应(aldol cleavage,逆向的醛醇缩合反应)**。它的非酶性的碱基催化机制见图14-4，它的**烯醇化**(enolate)中间物是共振稳定的，这是由于羰基氧原子拉取电子的结果。请注意醛醇缩合断裂是在FBP的C3和C4之间，要求在C2有一个羰基，C4上有一个羟基，因此糖酵解途径中反应2的“逻辑”——G6P到F6P的异构化反应是清楚的。G6P的醛醇断裂产生碳链长度不等的产物，而FBP的醛醇断裂结果得到二个可以互变的三碳化合物，因此可进入一个共同的降解途径。　389

两类不同作用机制的醛缩酶

醛醇断裂反应是通过增加电子的去定位化以稳定它的烯醇酸中间体而被催化的。根据它们烯醇酸中间体稳定的机制，醛缩酶可以分成两类，第一类醛缩酶存在于动物和植物中，反应如下(图14-5)：

步骤1：底物结合。

步骤2：FBP的羰基与活性中心中Lys的ε氨基形成一个亚胺阳离子，这是一个质子化的希夫碱。

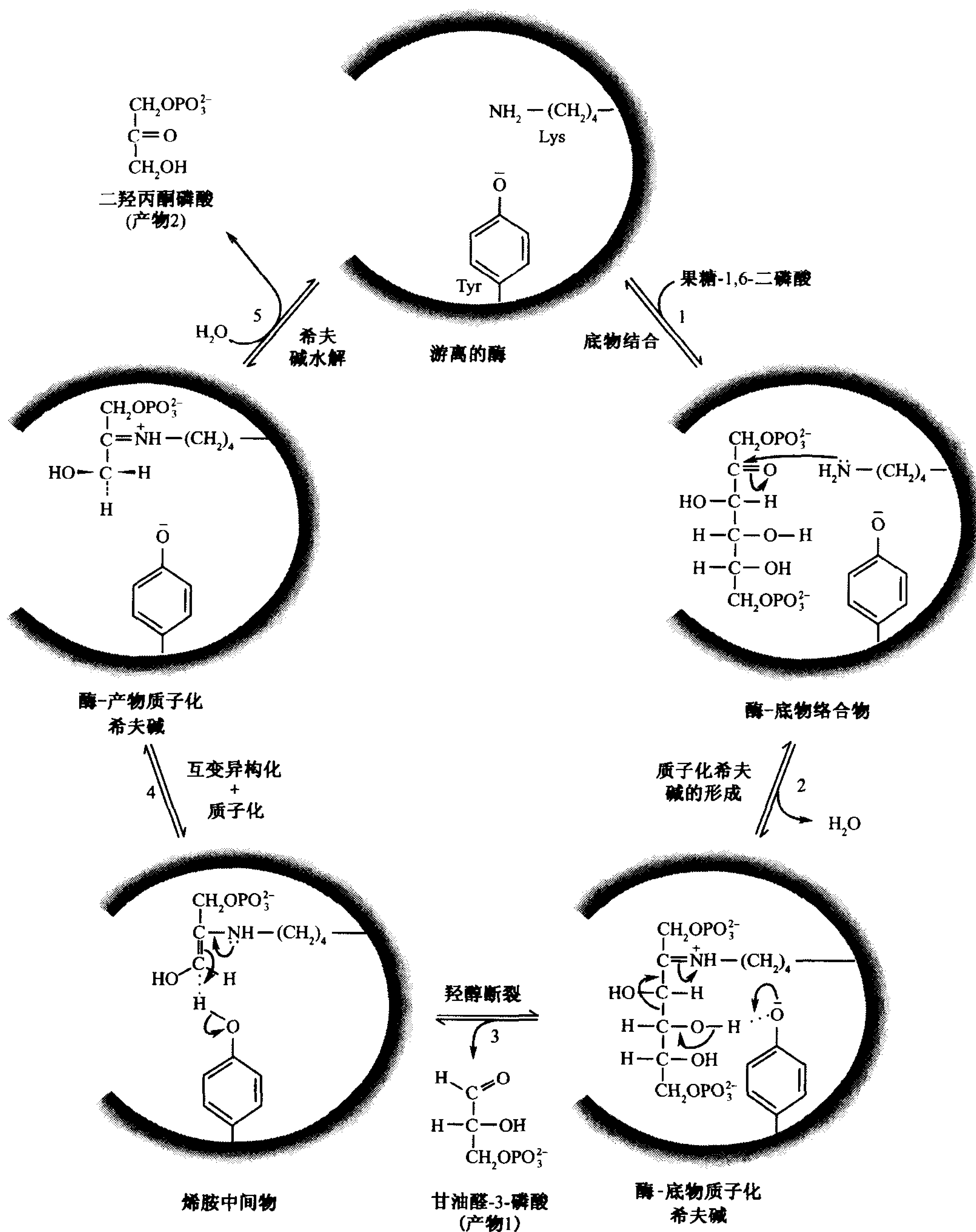


图 14-5 第Ⅰ类醛缩酶的作用机制

反应包括①底物的结合；②酶活性中心的 Lys 残基和开链型的 FBP 形成希夫碱；③醛醇断裂生成酶和 DHAP 的中间体，并释放出 GAP；④希夫碱的亚胺互变异构化和质子化；⑤希夫碱水解，放出 DHAP。

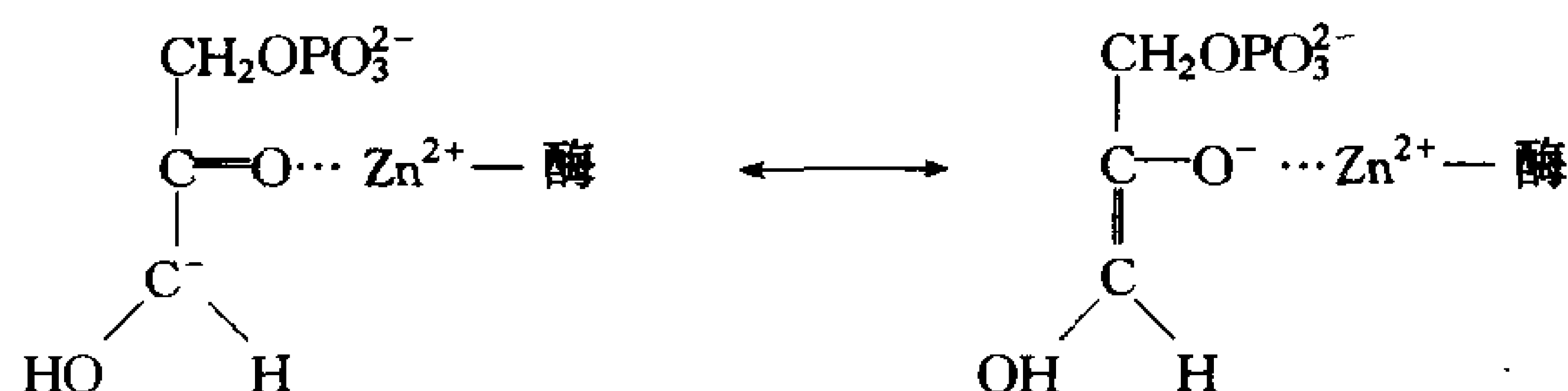
步骤 3：C3—C4 键断裂生成烯胺，并释出 GAP。亚胺离子是一个比它的前体羰基氧原子更好的拉开电子的基团，这样催化反应就发生了，因为烯胺中间物(图 14-5，步骤 3)比

碱基催化的醛醇断裂反应(图 14-4,步骤 2)中的烯醇酸中间物更加稳定。

步骤 4:烯胺质子化生成亚胺阳离子。

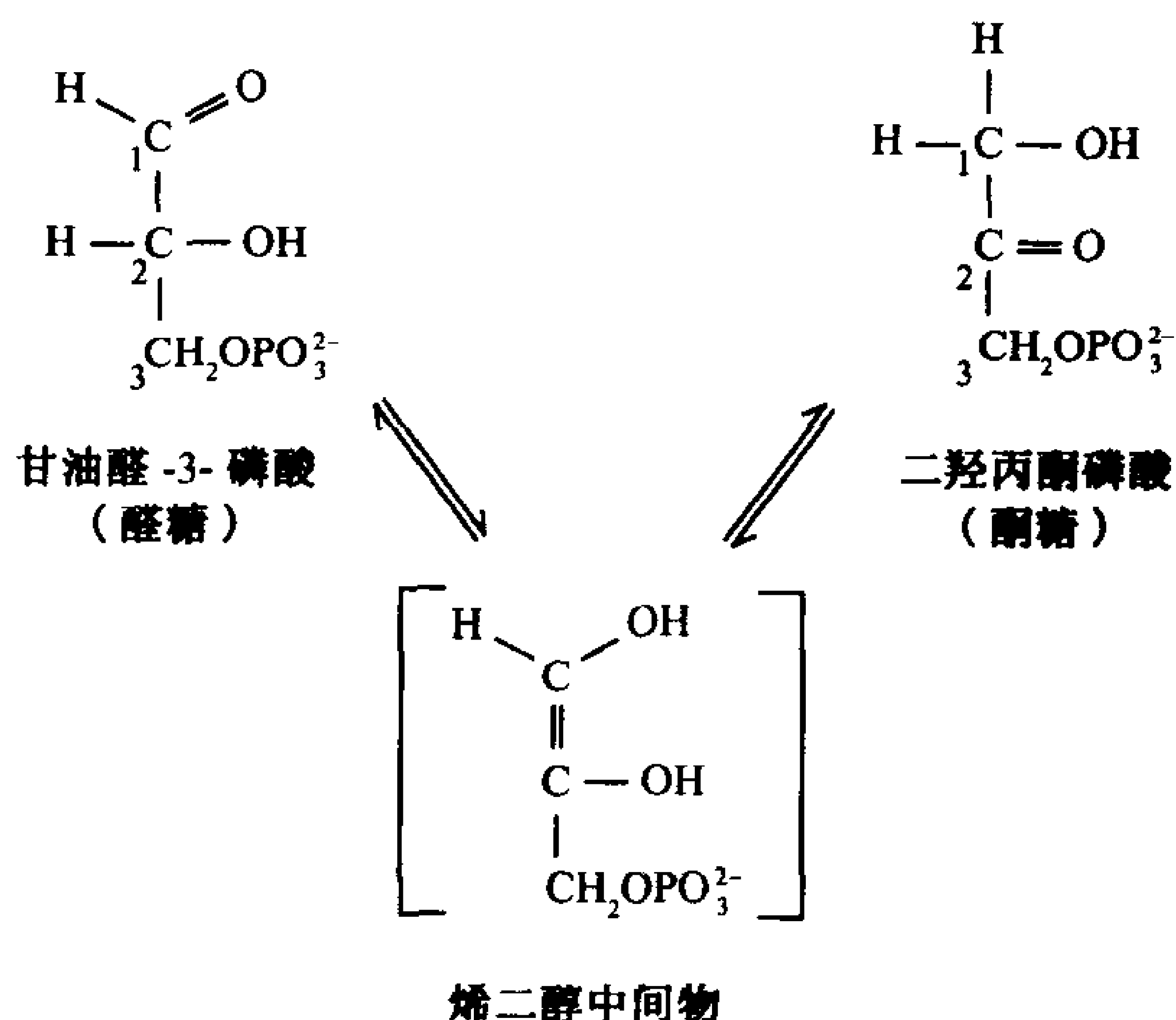
步骤 5:亚胺阳离子水解,释出 DHAP,游离酶再生。

第二类醛缩酶一般在真菌、藻类和某些细菌中存在,它不与底物生成 Schiff 碱,而是由一个二价阳离子,一般是 Zn^{2+} 或 Fe^{2+},使底物羰基氧极化,从而稳定反应的烯醇酸中间体。

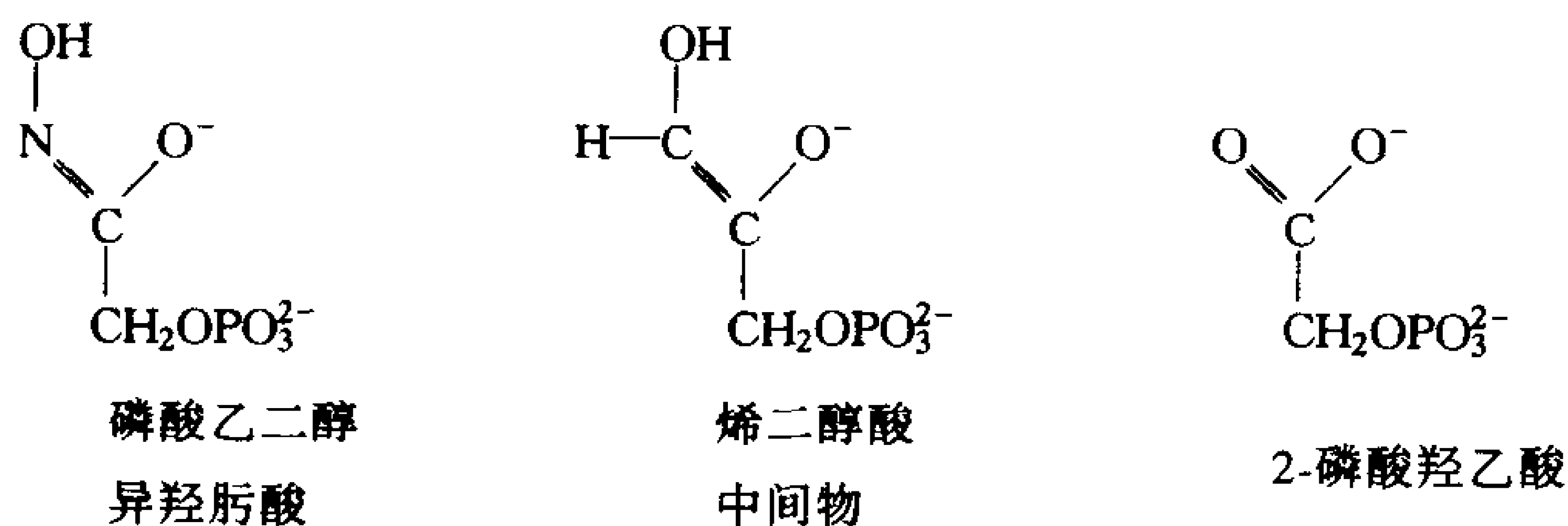


E. 丙糖磷酸异构酶

醛醇断裂反应只有一个产物即 GAP 继续沿着糖酵解途径进行(图 14-1),DHAP 和 GAP 是酮醛异构体(如同 F6P 和 G6P),它们通过烯二醇(或烯二醇酸)中间体进行异构化反应,从而相互转变。**丙糖磷酸异构酶**(TIM 或 TPI)催化糖酵解中的反应 5,即第 1 阶段的最后反应。



对这一反应的支持源于利用过渡态类似物**磷酸乙二醇异羟肟酸**(phosphoglycohydroxamate)和 **2-磷酸羟乙酸**(2-phosphoglycolate)两个稳定的化合物,它们的几何形状和假设的烯二醇或烯二醇酸中间体类似。



酶催化反应时与过渡态复合物的结合比与底物的结合要紧密得多(节 11-3F),并且,事实上,TIM 与磷酸乙二醇异羟肟酸和 2-磷酸羟乙酸的结合的紧密程度比和 GAP 或 DHAP 的结合要强 155 和 100 倍。

Glu 165 和 His 95 的作用就像一般的酸和碱

一般认为 GAP 转变为其烯醇式中间体是被普通的酸碱所催化，碱从 GAP 的 C2 上抽取一个质子，而酸则质子化它的羰基氧原子。X 射线研究显示 Glu 165 的侧链最适合从 GAP 上抽取 C2 位的质子(图 14-6)。事实上，Glu 165 如果被 Asp 突变取代，X 射线研究证明，与野生型酶比较，羧酸基团和底物的距离虽只拉开了 1Å，但 TIM 的催化活性却降低了 1000 倍。X 射线研究也表明，His 95 与质子化的 GAP 的羰基氧通过氢键结合而使之定位。带正电荷的 Lys 12 侧链，被认为对反应中带负电荷的过渡态有静电稳定的作用。在烯二醇中间体转变为 DHAP 的反应中，Glu 165 的作用就像普通的酸质子化 C1，而 His 95 的作用如同普通的碱从 OH 基上吸取质子，这样使催化基团又恢复到它的起始质子化状态。

392

一个柔性的环覆盖了活性中心

比较 TIM 和酶-磷酸乙二醇异羟肟酸复合物的 X 射线结构揭示：当底物和 TIM 结合时，一个保守的 10 个残基组成的环覆盖在活性中心上，就像一个有铰链的盖子，这一动作涉及主链移位 >7Å(图 14-6)。在此环中的一个 4 残基片段和底物的磷酸基团形成氢键，通过突变剪除这 4 个残基并不会使蛋白质明显变形，和底物的结合因而也不会受到很大伤害。然而这种变体酶的催化能力降低了 10^5 倍，而且只能和磷酸乙二醇异羟肟酸有很弱的结合。显然，环的覆盖有利于稳定酶反应中的烯二醇样中间态。

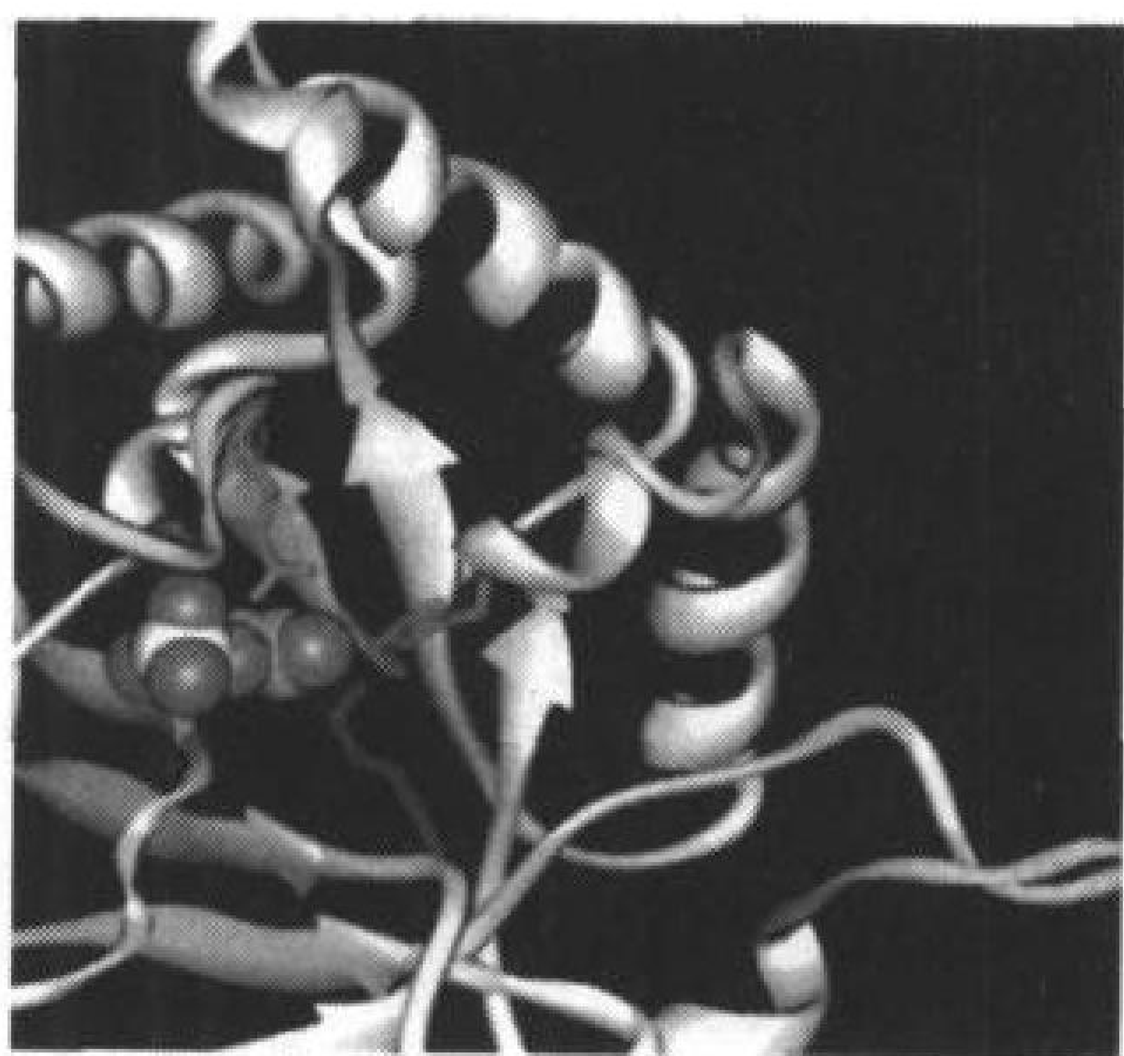
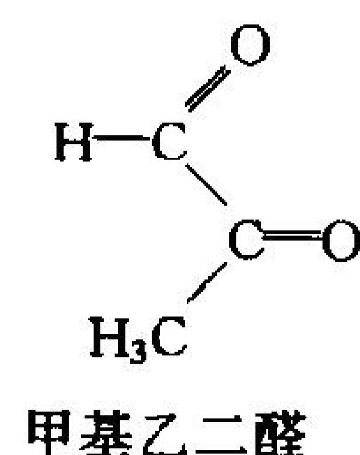


图 14-6 酵母 TIM 和它的过渡态类似物 2-磷酸羟乙酸复合物的带状图

粗略地沿 α/β 桶的轴观察同二聚体酶的一个亚基。酶的柔性环为花青色，催化中心 Lys、His 和 Glu 残基的侧链分别用蓝色、洋红和红色表示；2-磷酸羟乙酸用空间填充的模式表示，颜色则按照原子种类：(C，绿色；O，红色；P，黄色)。(引自 Gregory Petsko, Brandeis 大学所测定的 X 射线结构)

TIM 反应中环的覆盖也提供了所谓**立体电子控制**(stereoelectronic control)的一个有力的例子，这种作用为酶在反应中所运用。在溶液中，烯二醇中间体 C3 上的磷酸易被去除而分解成有毒性的化合物**甲基乙二醛**(methylglyoxal)：



甲基乙二醛

然而，在酶的表面这一反应是不会发生的，因为磷酸基团被柔性环保持在一个不利于被清除的位置上。在缺少柔性环的突变酶中，烯二醇可以逃逸：大约 85％的烯二醇中间体被释入溶液中，并很快被分解为甲基乙二醛和 P_i。所以，柔性环的关闭，保证了底物能有效地转变为产物。

α/β 桶状结构酶有可能在趋异进化中演化

TIM 是第一个被阐明含有 α/β 桶状结构的蛋白质(因此也被称为 TIM 桶)，是由 8 个平行的 β 折叠被 8 个平行的 α 螺旋围绕构成的圆柱体(见图 6-27c 和 6-28d)。这种引人注目的结构已经在多种不同的蛋白质中发现，基本上它们都是酶(包括糖酵解中的酶：醛缩酶、烯醇化酶和丙酮酸

激酶)，引起兴趣的是所有已知有 α/β 桶状结构的酶的活性中心都位于桶的末端的嘴部，桶末端包含了 β 折叠的 C 末端，虽然对此还没有明显的结构上的合理解释。尽管这些蛋白质并没有表现出明显的序列上的相似性，但推测它们都是从一个共同的祖先演化而来的(趋异进化)。然而，对此也有争论，认为 α/β 桶是一种特别稳定的排列，是自然界在无数次选择中独立发现的(趋同进化)。

393

丙糖磷酸异构酶是一个完美的酶

Jeremy Knowles 曾经阐述了 TIM 达到的**催化的完美性**(catalytic perfection)，这意味酶和底物间的双分子反应是扩散控制的，所以产物生成之快就像酶和底物在溶液中碰撞一样。在 TIM 的催化反应中，无论增加任何提高效率的措施都不再能增加它的反应速度。

GAP 和 DHAP 之间的互变是如此的有效，使这两个代谢物的浓度一直保持在它们的平衡值：$K=[GAP]/[DHAP]=4.73\times10^{-2}$。达到平衡时，[DHAP]≫[GAP]，然而在细胞中稳态条件下，GAP 在糖酵解途径进行的反应中被消耗。*当 GAP 在这种情况下不断被取走时，更多的 DHAP 就转变为 GAP，以保持平衡的比例。*实际上，DHAP 随 GAP 之后也进入了糖酵解的第二阶段，这就是在代谢中醛缩酶反应的两个产物只通过一条途径的原因。

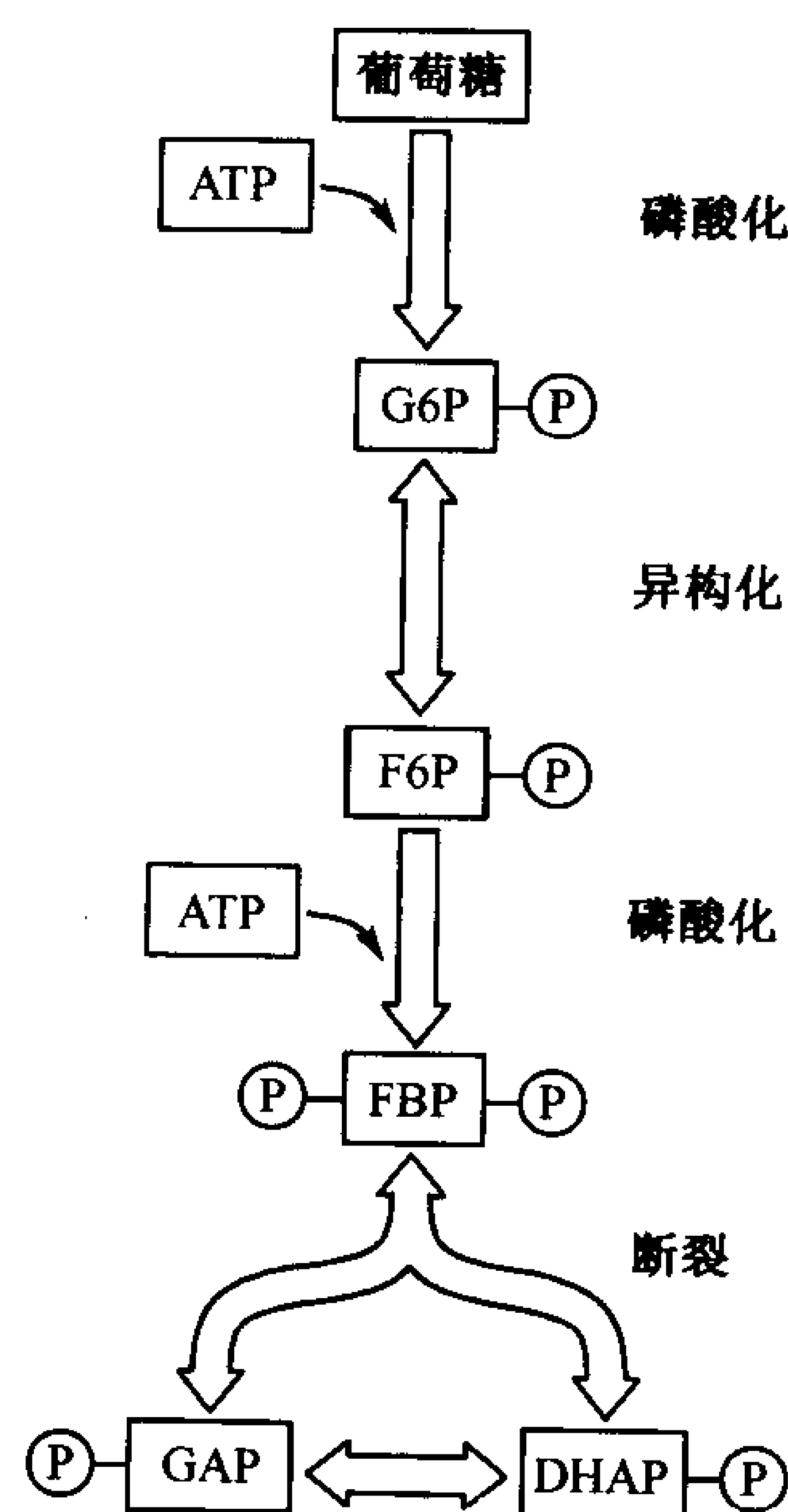


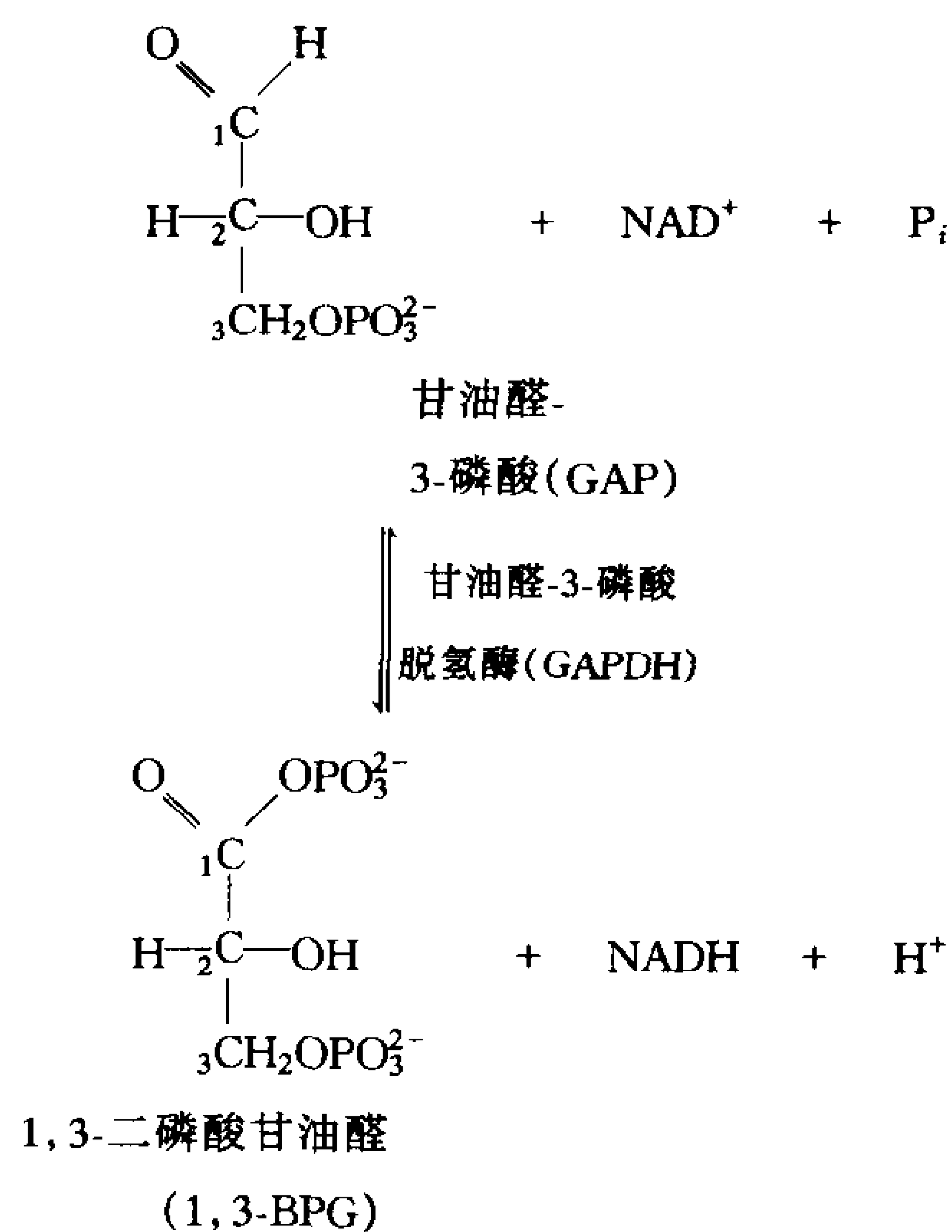
图 14-7　糖酵解第一阶段的示意图解
在这一系列的反应中，一个己糖被磷酸化、异构化、再次磷酸化，然后裂解为二个可以互相转变的丙糖磷酸，在此过程中，消耗了 2 个 ATP。

至此估算糖酵解的能耗

糖酵解进行到这一点上，一个分子的葡萄糖已经转变为 2 个分子的 GAP，这就完成了糖酵解的第一阶段(图 14-7)。注意有 2 个 ATP 已经在产生磷酸化中间物时被消耗掉。这一能量的投入还没有得到回报，但是这里有着小小的化学艺术性，“低能”的 GAP 可被转变成“高能”的化合物，在糖酵解的第二阶段这些高能化合物的水解自由能可以与 ATP 的合成偶联。

F. 甘油醛-3-磷酸脱氢酶：第一个“高能”中间物的形成

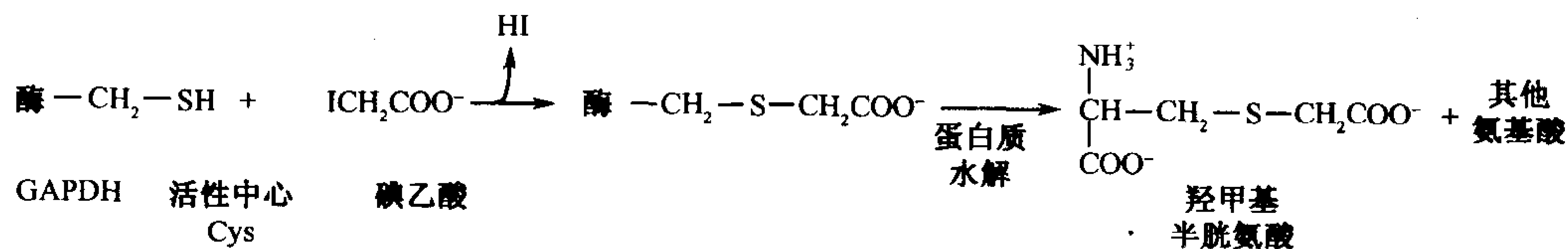
糖酵解的反应 6 是 GAP 被 NAD^+ 和 P_i 氧化磷酸化，此反应为**甘油醛-3-磷酸脱氢酶**(GAPDH；图 6-30)所催化。这就是上面提到的化学艺术性的第一个例子。*在这个反应中，醛氧化作用是一个放能反应，推动了“高能”酰基磷酸*——**1，3-二磷酸甘油醛**(1，3-BPG)*的合成。*记住酰基磷酸是一个具有很强的磷酸化基团转移势能的化合物(节 13-2C)。



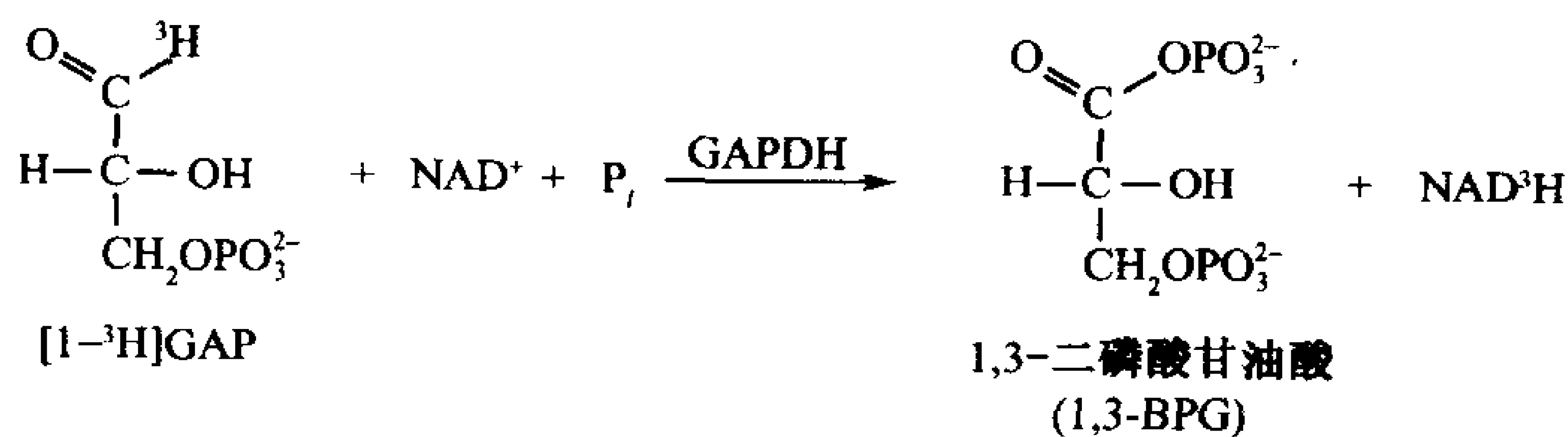
机制研究

几个关键性的酶学试验对阐明 GAPDH 的反应机制作出了贡献：

(a)



(b)



(c)

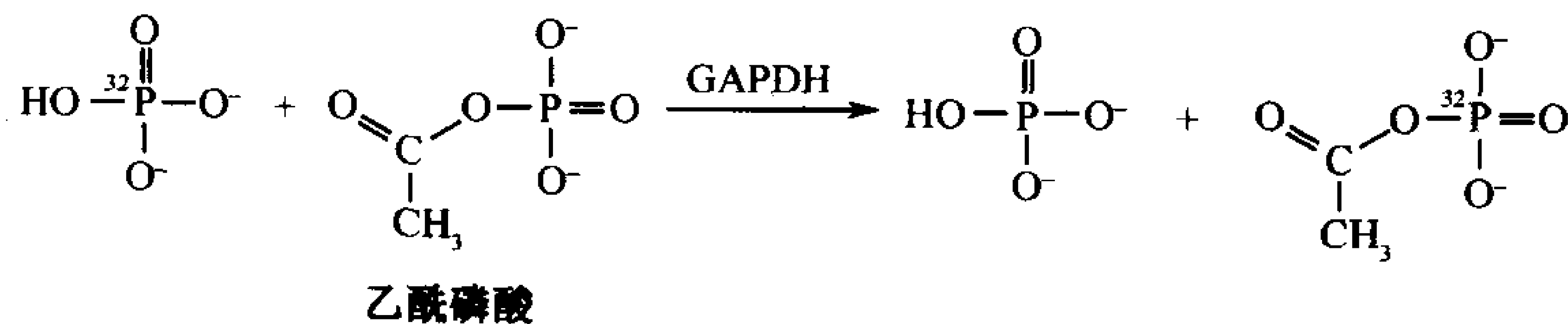


图 14-8 用以说明 GAPDH 的酶作用机制的几个反应

(a) 碘乙酸和活性中心 Cys 残基的反应。(b) ^{3}H 从底物定量地转移到 NAD$^+$ 上。(c) 酶催化^{32}P 从磷酸盐到乙酰磷酸上的交换。

1) GAPDH 可以被化学计量的碘乙酸烷基化而失活。当烷基化酶被水解时产生**羧甲基半胱氨酸**(carboxymethylcystein, 图 14-8a)，由此认为 GAPDH 的活性中心有一个半胱氨酸巯

基。

2) GAPDH 可以从 GAP 的 C1 上将 ^3H 定量地转移给 NAD^+（图 14-8b），从而确立了此反应的发生是通过直接的氢转移。

3) GAPDH 可以催化 ^{32}P 在 P_i 和产物类似物乙酰磷酸（acetyl phosphate，图 14-8c）之间的交换。这种同位素交换反应是存在一个酰化-酶中间物的特征；亦即乙醛基与酶形成一个共价复合物，类似于丝氨酸蛋白酶反应机制中的酰化-酶中间物。

David Trentham 基于这些信息和动力学研究的结果，提出 GAPDH 的作用机制（图 14-9）：

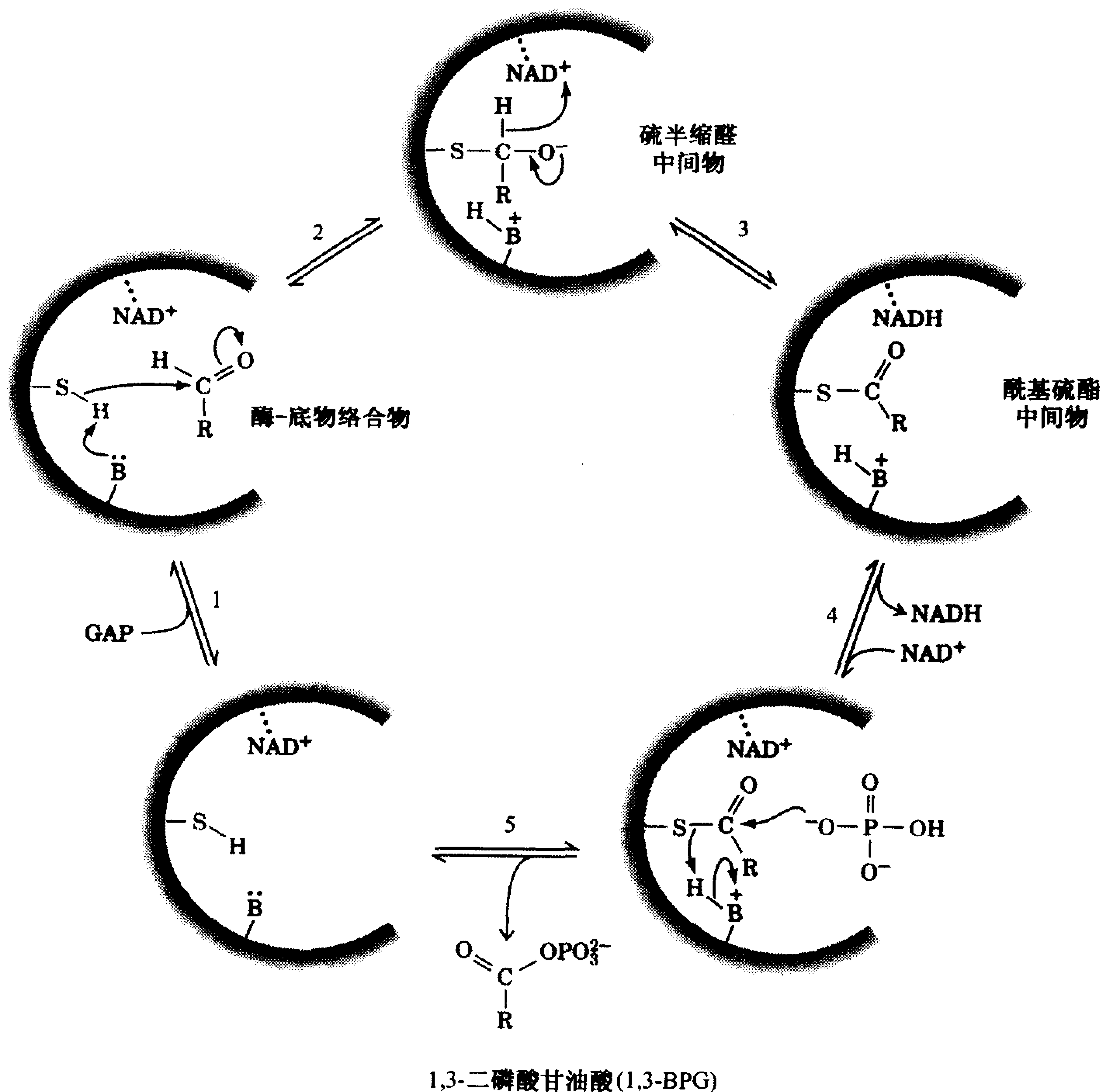


图 14-9 GAPDH 的作用机制

(1) GAP 与酶结合。(2) 活性中心的巯基与底物形成硫半缩醛。(3) NAD^+ 将硫半缩醛氧化为硫酯。(4) NAD^+ 替代了新生成的 NADH。(5) P_i 攻击硫酯形成酰基磷酸产物——1,3-BPG，活性酶再生。

步骤 1：GAP 与酶结合。

步骤 2：必需的巯基，作为亲核试剂，攻击醛基形成**硫半缩醛**（thiohemiacetal）。

步骤 3：硫半缩醛通过直接的氢转移给 NAD^+，并继续氧化形成**酰基硫酯**（acyl thioester），此中间物已被分离，它含有很大的水解自由能。因此，*醛基氧化的能量并没有被浪费，而是通过硫酯的合成和 NAD^+ 还原成 NADH 而被保存了*。

395 步骤 4:另一分子 NAD^+ 替代了 NADH。

步骤 5:硫酯中间物受 P_i 的亲核攻击再生出游离的酶和形成“高能”混合酐 1,3-BPG。

G. 磷酸甘油酸激酶:第一次 ATP 的产生

糖酵解途径的反应 7 在**磷酸甘油酸激酶**(PGK,见下图)的催化下产生 ATP 和 **3-磷酸甘油酸**(3PG)。(注意此酶被称为“激酶”是因为其逆反应的磷酸基团从 ATP 转移到 3PG 上)。 396

PGK(图 14-10)的外观呈明显的双叶片结构,Mg^{2+}-ADP 的结合位点位于一个结构域上,它和位于另一结构域上的 1,3-BPG 结合位点大约相距 10Å。物理学测定指出,在底物的结合位点上,PGK 的二个结构域合拢,以保证底物在一个无水的环境中反应,就像在己糖激酶中发生的情形(节 14-2A)一样。事实上 PGK 的外观与己糖激酶(图 14-2)十分相似,除此之外,这些酶蛋白的结构并无关系。

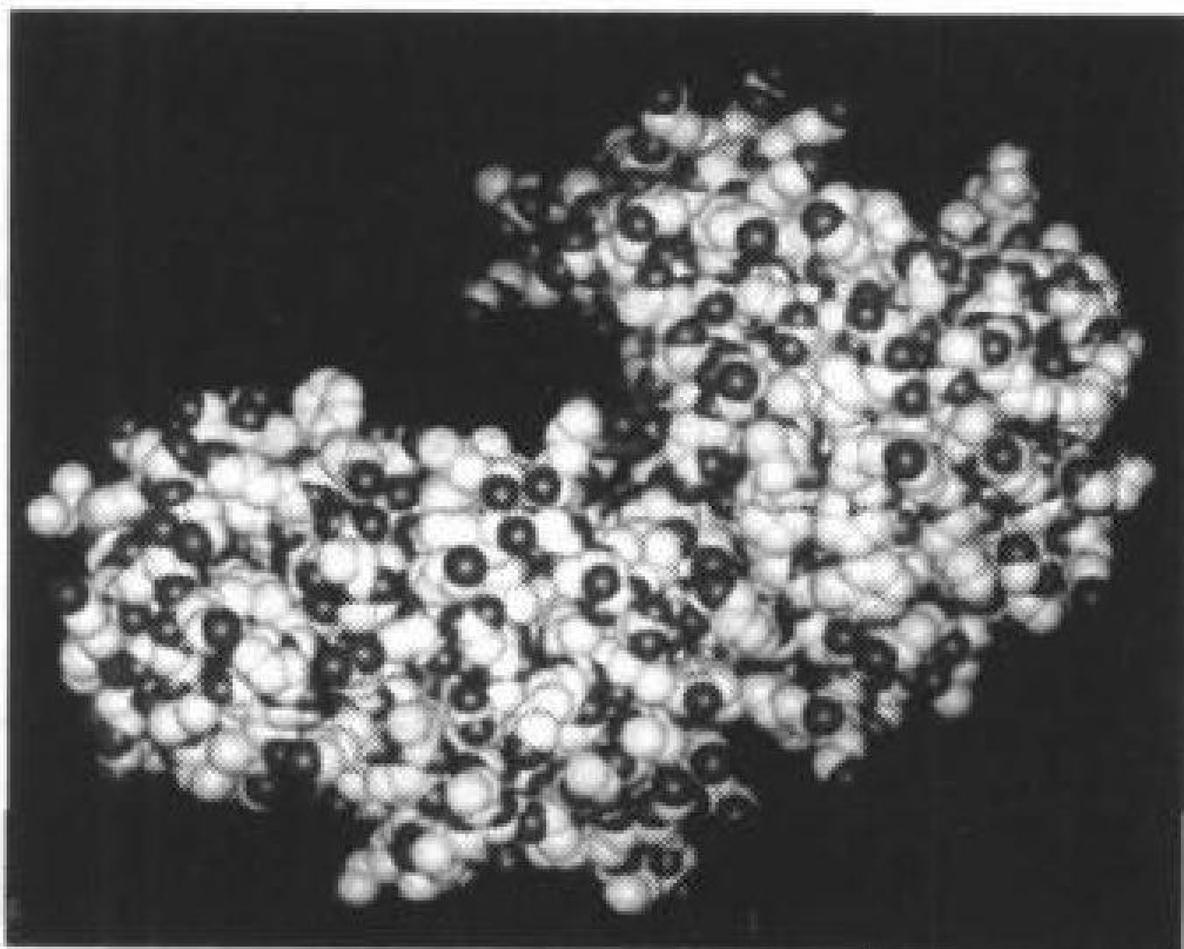
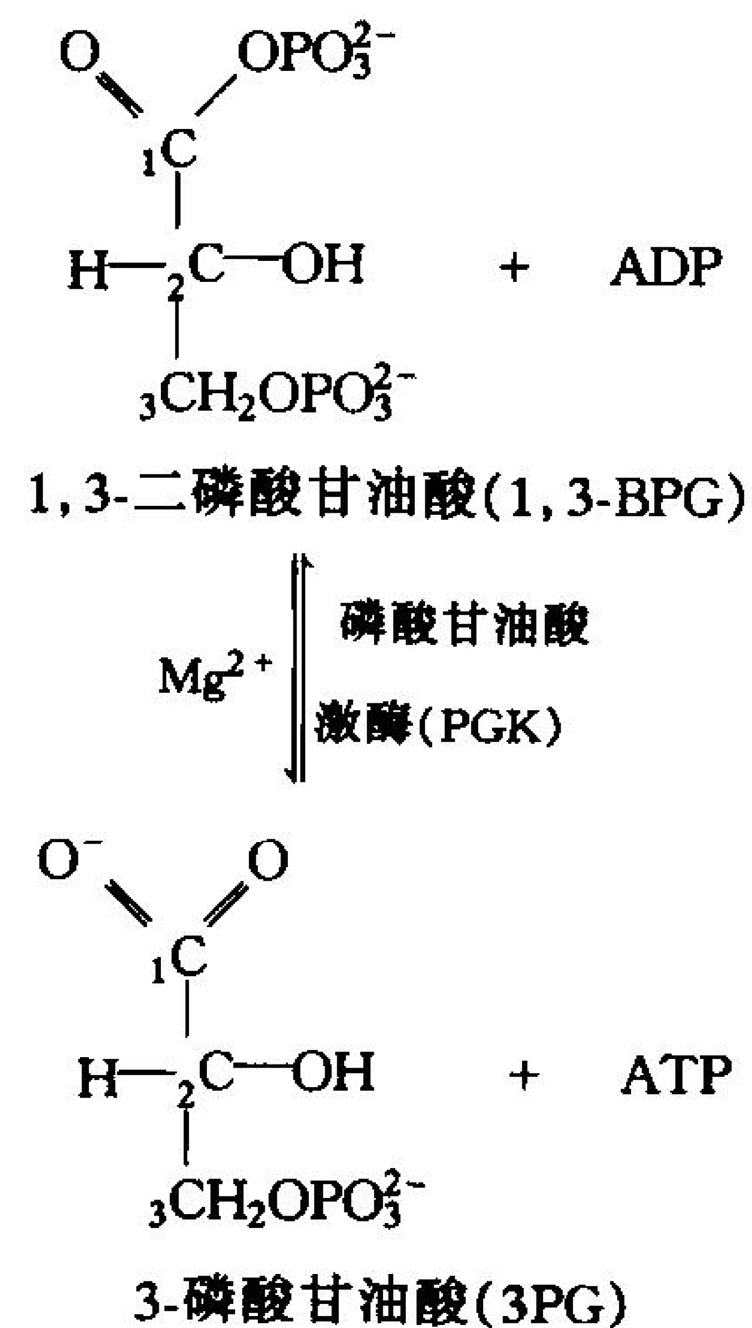


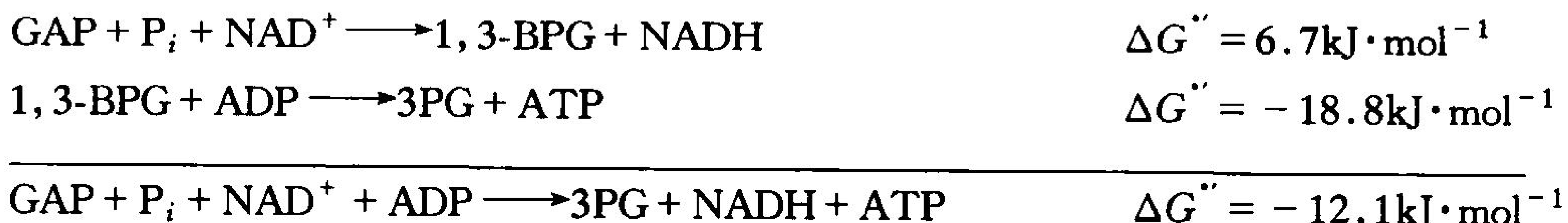
图 14-10 酵母磷酸甘油酸激酶的空间填充模型

底物结合位点是在蛋白质两叶之间的深沟的底部,这个位置用 3PG 的 P 原子(洋红色)标示。将此结构与己糖激酶(图 14-2a)比较。(引自 Bristol 大学 UK 的 Herman Watson 的 X 射线结构)



GAPDH 和 PGK 反应间的偶联

如节 13-2B 所述,一个不太有利的反应可以和一个高度有利的反应偶联,从而使二个反应都能向前进行。在糖酵解的第 6 和第 7 反应中,1,3-BPG 是它们共同的中间物。它在 PGK 反应中的消耗拉动 GAPDH 反应向前,这对反应的能量为



$$\mathrm{GAP} + \mathrm{P}_i + \mathrm{NAD}^+ \longrightarrow 1,3\text{-BPG} + \mathrm{NADH} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = 6.7\,\mathrm{kJ\cdot mol^{-1}}$$

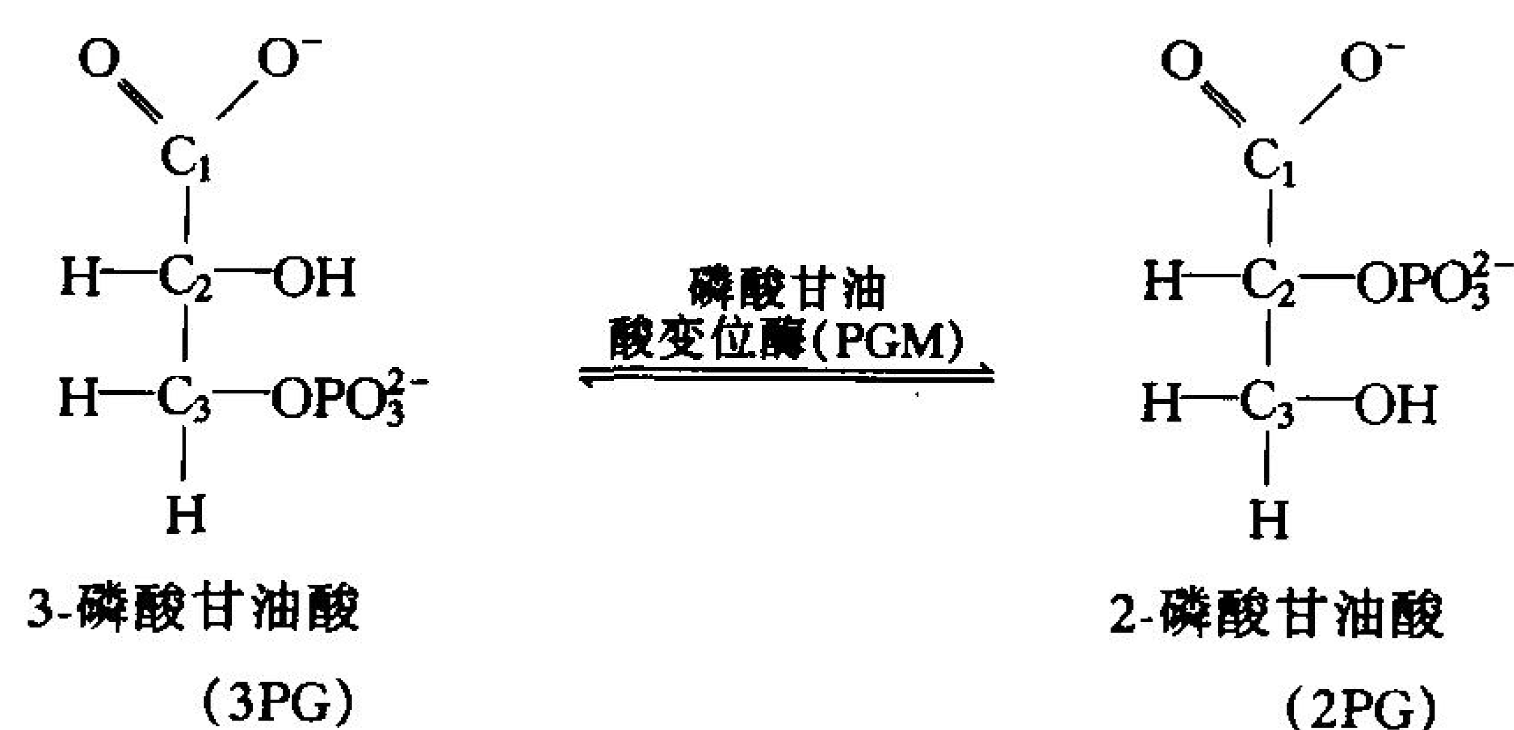
$$1,3\text{-BPG} + \mathrm{ADP} \longrightarrow 3\mathrm{PG} + \mathrm{ATP} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -18.8\,\mathrm{kJ\cdot mol^{-1}}$$

$$\mathrm{GAP} + \mathrm{P}_i + \mathrm{NAD}^+ + \mathrm{ADP} \longrightarrow 3\mathrm{PG} + \mathrm{NADH} + \mathrm{ATP} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -12.1\,\mathrm{kJ\cdot mol^{-1}}$$

虽然 GAPDH 反应是一个吸能反应,但将一个磷酸基团从 1,3-BPG 上转到 ADP 上的过程是一个强放能反应,这就十分有利于从 GAP、P_i、NAD^+ 和 ADP 合成 NADH 和 ATP 的总过程,这种 ATP 的产生并不涉及氧,这是底物水平上的磷酸化作用的一个例子。在此反应中产生的 NADH 随后被 O_2 氧化,通过氧化磷酸化产生出更多的 ATP,我们将在节 17-3 中看到。

H. 磷酸甘油酸变位酶

糖酵解途经的反应8，3PG通过**磷酸甘油酸变位酶(PGM)**转变为**2-磷酸甘油酸(2PG)**，**变位酶**(mutase)催化分子内的一个功能基团从一个位置转移到另一个位置的反应。这个在能量上或多或少属于中性的反应是为糖酵解产生一个"高能"磷酸化合物的下一步做必要的准备。



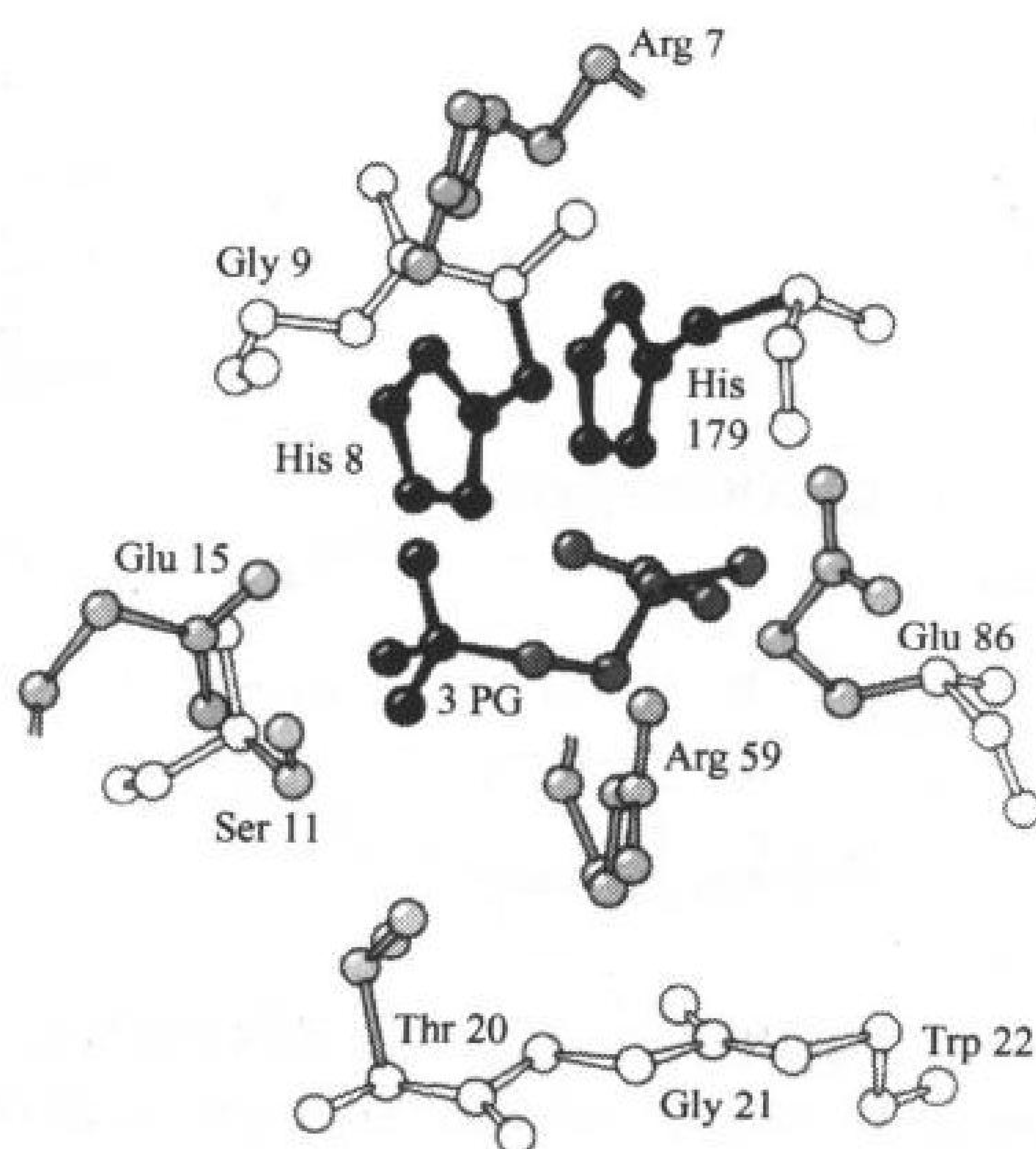


图 14-11　酵母磷酸甘油酸变位酶的活性中心区(去磷酸型)

底物3PG结合到离子化的口袋中，His 8在活性酶中是被磷酸化的。[引自 Winn, S. I., Watson, H. I., Harkins, R. N., and Fothergill, L. A., *Phil. Trans. R Soc. London Ser*. B 293, 126(1981)]

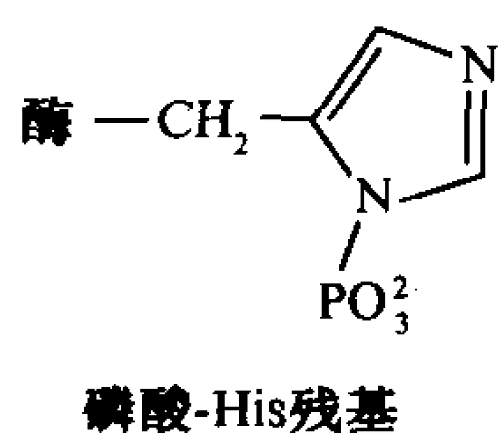
磷酸甘油酸变位酶的作用机制

粗略一看，磷酸甘油酸变位酶催化的反应似乎只是简单的分子内部磷酸基团的转移而已。其实并非如此简单，活化的酶在其活性中心上有一个磷酸基团与His 8连接(见下)，这个磷酸基团转移到底物上，形成一个二磷酸中间物，这个中间物再经磷酸化变位酶，生成产物和再生活性酶，这个酶的X射线结构显示His 8与底物邻近(图14-11)。磷酸甘油酸变位酶的催化过程如下(图14-12)：

步骤1:3PG结合到已被磷酸化的酶的His 8上。

步骤2:酶的磷酸化基团被转移到底物上，形成2，3-二磷酸-酶中间复合物。

步骤3和4:复合物分解生成产物2PG并再生磷酸化酶。



因此 3PG 的磷酸基团最后定位在紧接着的 2PG 的 C2 上进入反应。

偶然,在反应的步骤 2 中形成的 2,3-二磷酸甘油酸(2,3-BPG)会从去磷酸的酶上解离下来,使酶成为一种失活状态。微量的 2,3-BPG 必须经常存在,通过逆反应再生有活性的磷酸化酶。2,3-BPG 也会被特异地结合在去氧血红蛋白上,结果使之与 O_2 的亲和力下降(节 7-2C)。不过红细胞需要的 2,3-BPG 的量($5mmol·L^{-1}$)比用于启动磷酸甘油酸变位酶所需的量要多得多(见框 14-1)。

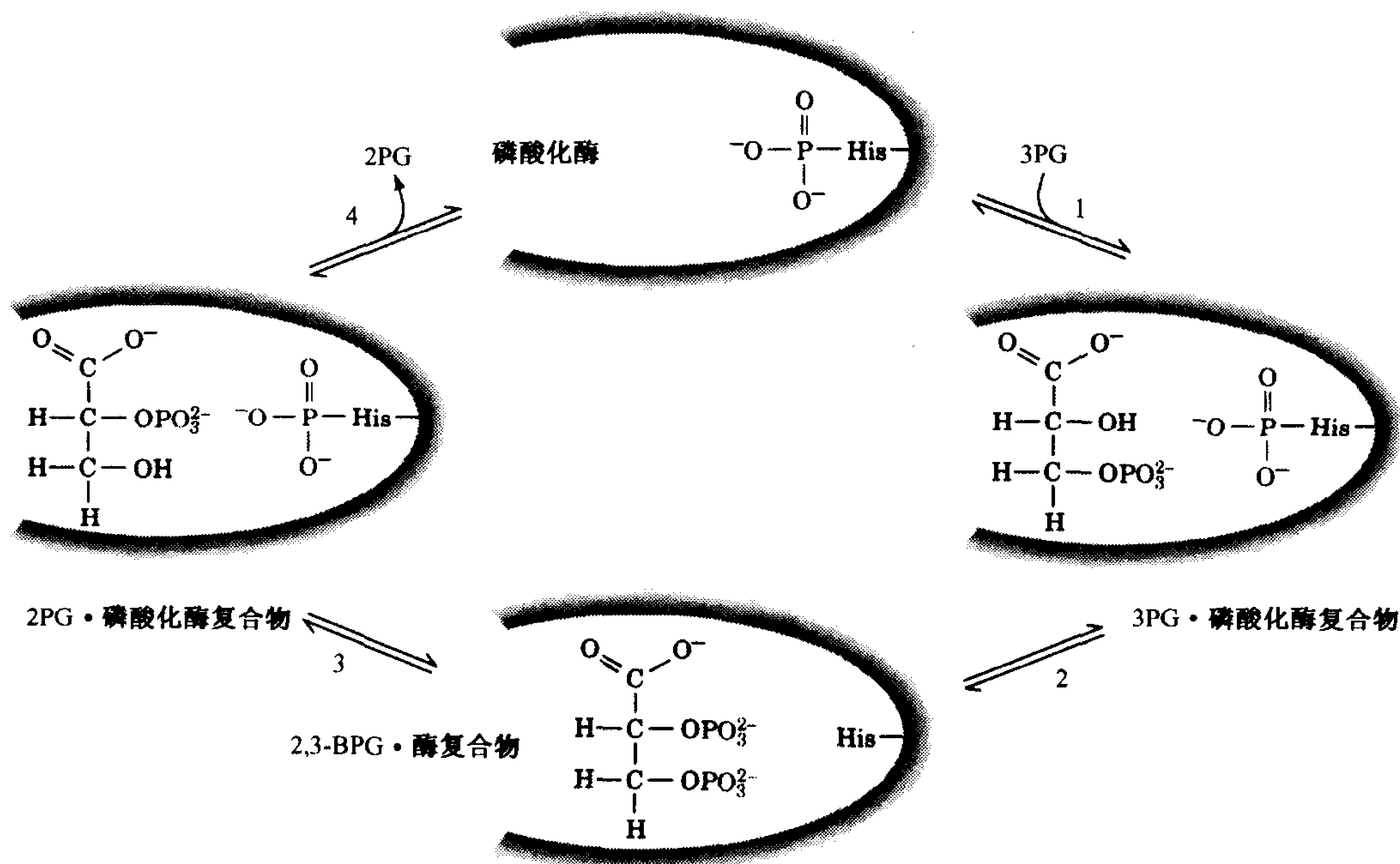


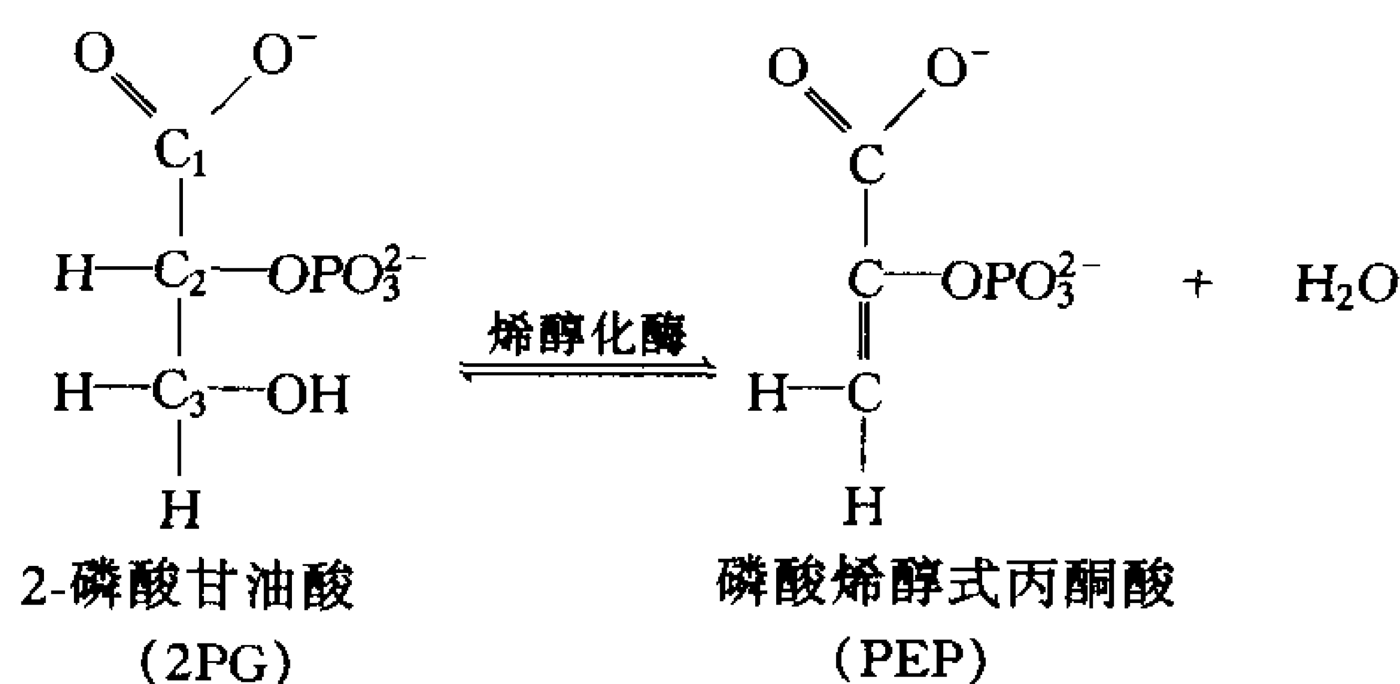
图 14-12 推测的磷酸甘油酸变位酶的作用机制

活性酶在其活性中心上有一个磷酸化的 His 8 残基。(1)形成酶-底物复合物。(2)将酶结合的磷酸基团转移到底物上。(3)酶被底物上的另一个磷酸基团重新磷酸化。(4)释放底物,活性的磷酸化酶再生。

398

I. 烯醇化酶:第二个"高能"中间物的生成

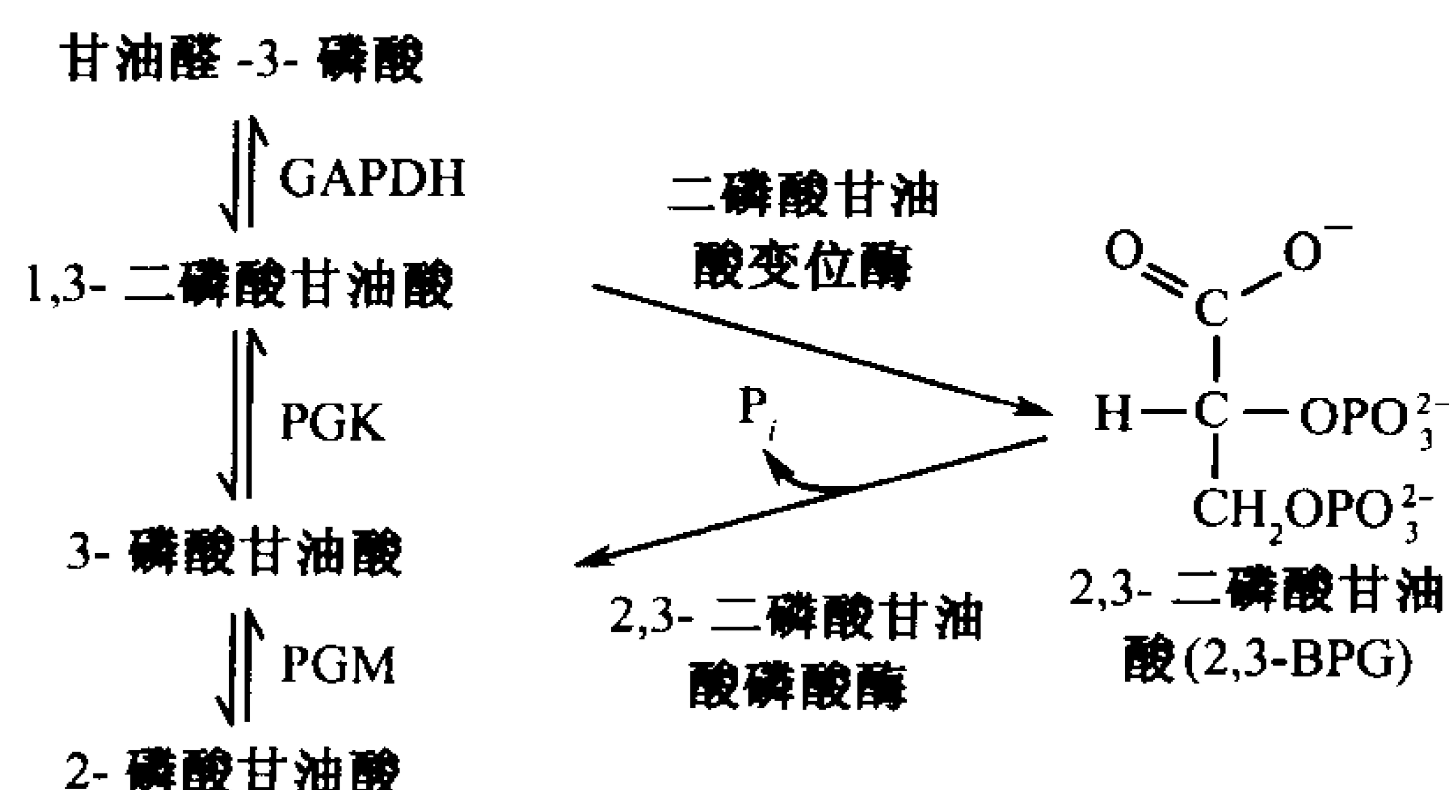
在糖酵解的反应 9 中,2PG 脱水成为**磷酸烯醇式丙酮酸**(PEP),此反应为**烯醇化酶**(enolase)所催化。此酶在与底物结合前先与一个二价阳离子如 Mg^{2+} 形成复合物。氟离子可以通过中断烯醇化酶活性抑制糖酵解(F^- 是用于阐明糖酵解途径的代谢抑制剂之一)。当 P_i 存在时,F^- 通过与酶活性中心的 Mg^{2+} 形成复合物阻断了底物与烯醇化酶的结合,因此烯醇化酶的底物 2PG 堆积,通过 PGM 的作用,3PG 也堆积了。



框 14-1　生物化学焦点

红细胞中 2,3-二磷酸甘油酸的合成和它对血液携氧能力的影响

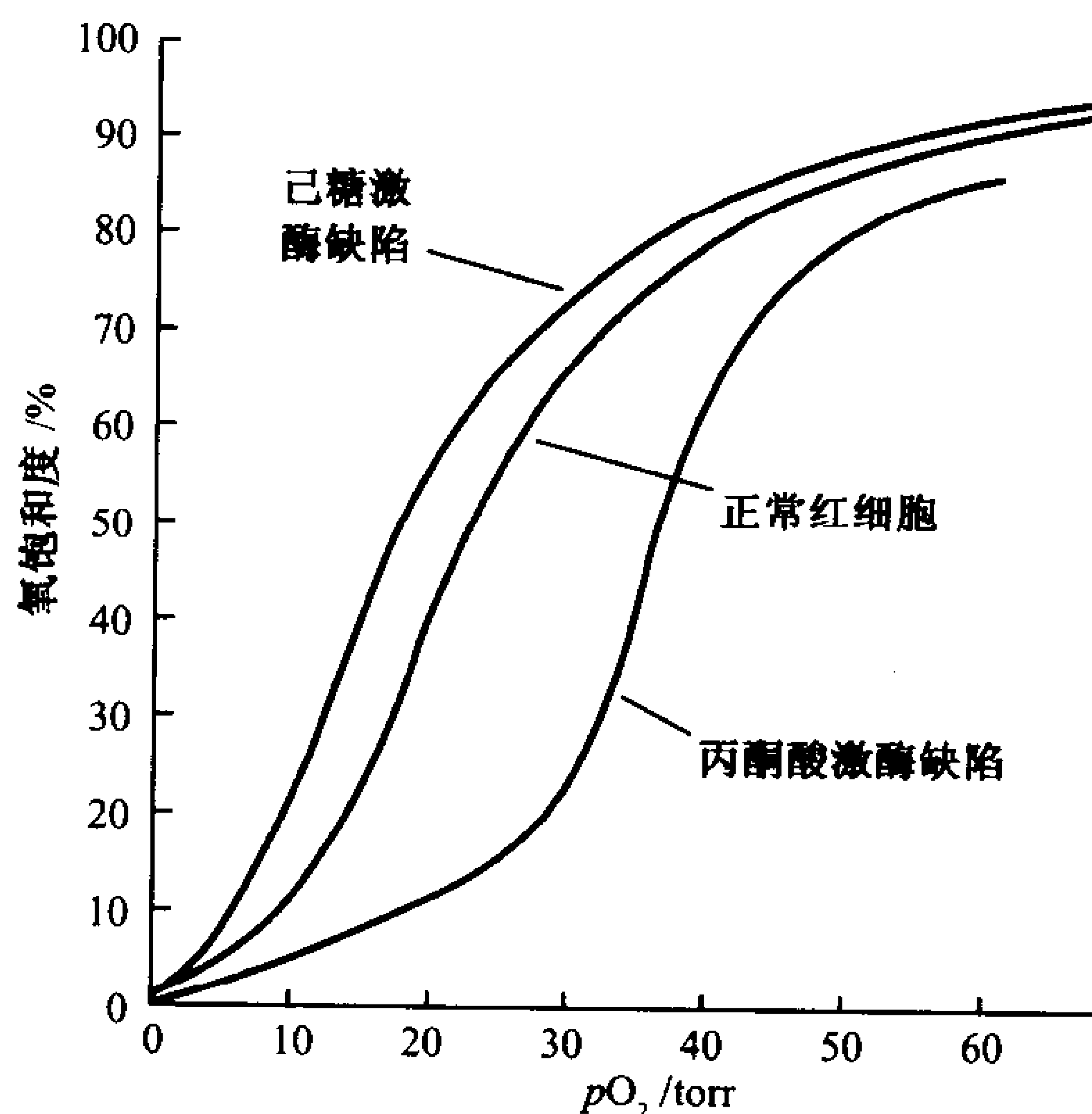
2,3-二磷酸甘油酸(2,3-BPG)与去氧血红蛋白的特异性结合降低了血红蛋白的氧亲和力(节 7-2C)。红细胞通过糖酵解途径的一个支路合成和降解 2,3-BPG。



二磷酸甘油酸变位酶催化磷酸基团从 1,3-BPG 的 C1 转移到 C2 上，接着 2,3-BPG 被 2,3-二磷酸甘油酸磷酸酶水解为 3PG，3PG 再继续通过糖酵解途径代谢。

2,3-BPG 的水平可调节血红蛋白的氧亲和力。因而有糖酵解遗传缺陷的红细胞其血液的携氧能力就会有改变，如血红蛋白的氧饱和曲线所示。

例如，在己糖激酶缺陷的红细胞中，所有糖酵解中间物浓度都较低(因为己糖激酶催化糖酵解的第一步)，结果是 2,3-BPG 的浓度也降低，血红蛋白的氧亲和力(绿色曲线)上升。相反，丙酮酸激酶缺陷(催化糖酵解的最后一步反应)，由于阻断，增加了 2,3-BPG 的浓度，血红蛋白的氧亲和力降低(紫色曲线)。所以红细胞虽然没有细胞核和其他细胞器，只有很低的代谢，但这种代谢却具有生理学意义。

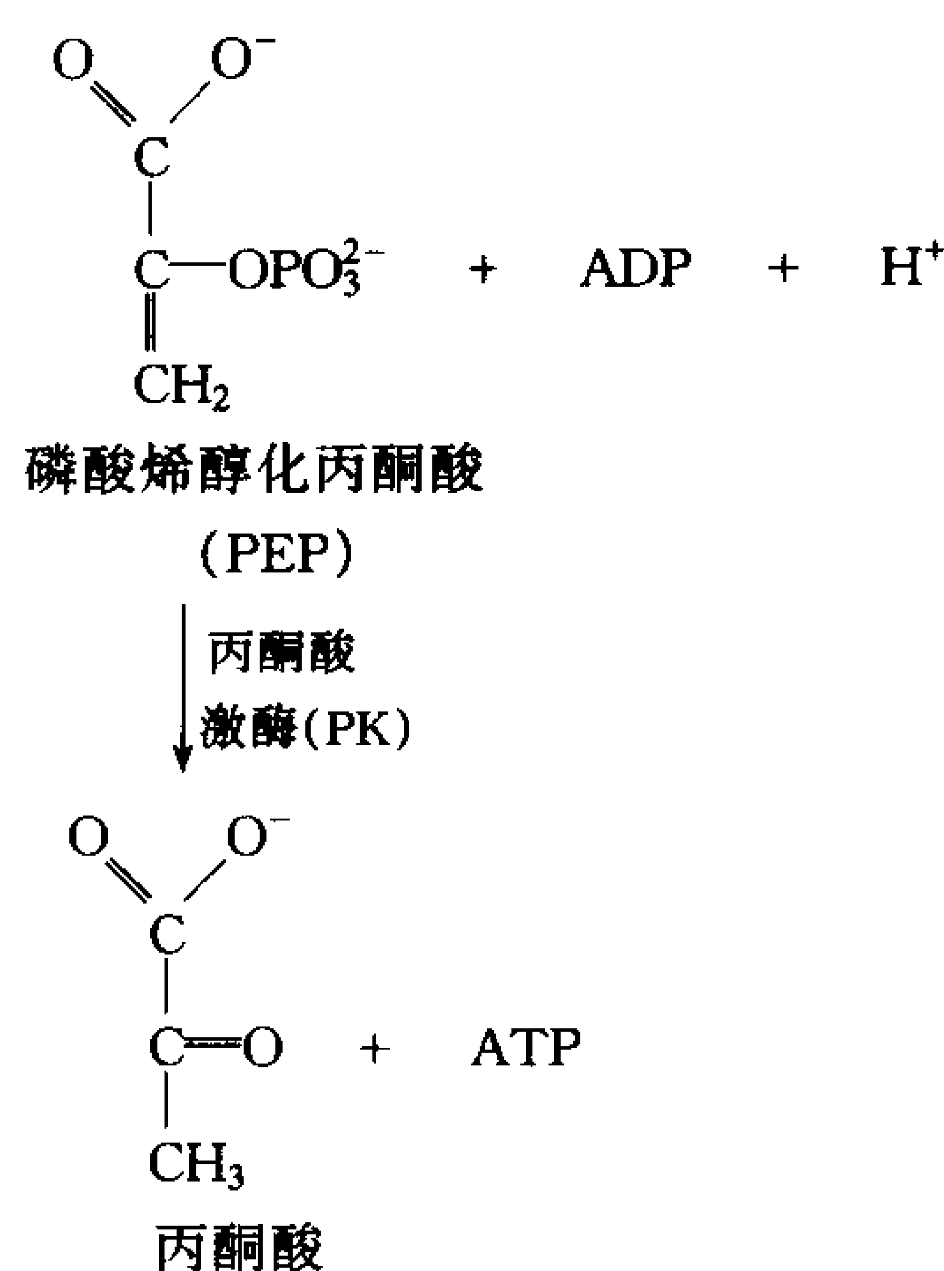


[氧饱和曲线取自 Delivoria-Papadopoulos, M., Oski, F. A., and Gottlieb, A. J., *Science* 165, 601(1969)]

J. 丙酮酸激酶：第二个 ATP 的产生

399

糖酵解中的反应 10 是最后一步反应，**丙酮酸激酶**(PK)与 PEP 断裂时的自由能偶联，在丙酮酸生成时，也合成了 ATP。



丙酮酸激酶的催化机制

PK 反应需要单价(K^+)和二价(Mg^{2+})阳离子,过程如下(图 14-13):

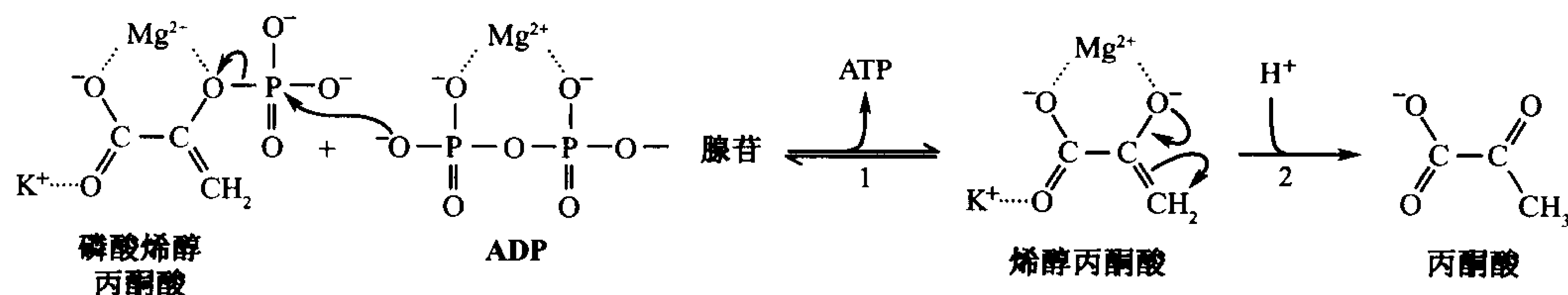


图 14-13 丙酮酸激酶催化反应的机制

(1) ADP 的 β-磷酰氧原子对 PEP 磷原子的亲核攻击,生成 ATP 和烯醇式丙酮酸。(2)烯醇式丙酮酸通过互变异构作用生成丙酮酸。

步骤 1:ADP 的 β-磷酰氧对 PEP 磷原子进行亲核攻击,藉此置换出**烯醇式丙酮酸**(enolpyruvate),并生成 ATP。

步骤 2:烯醇式丙酮酸互变异构为丙酮酸。

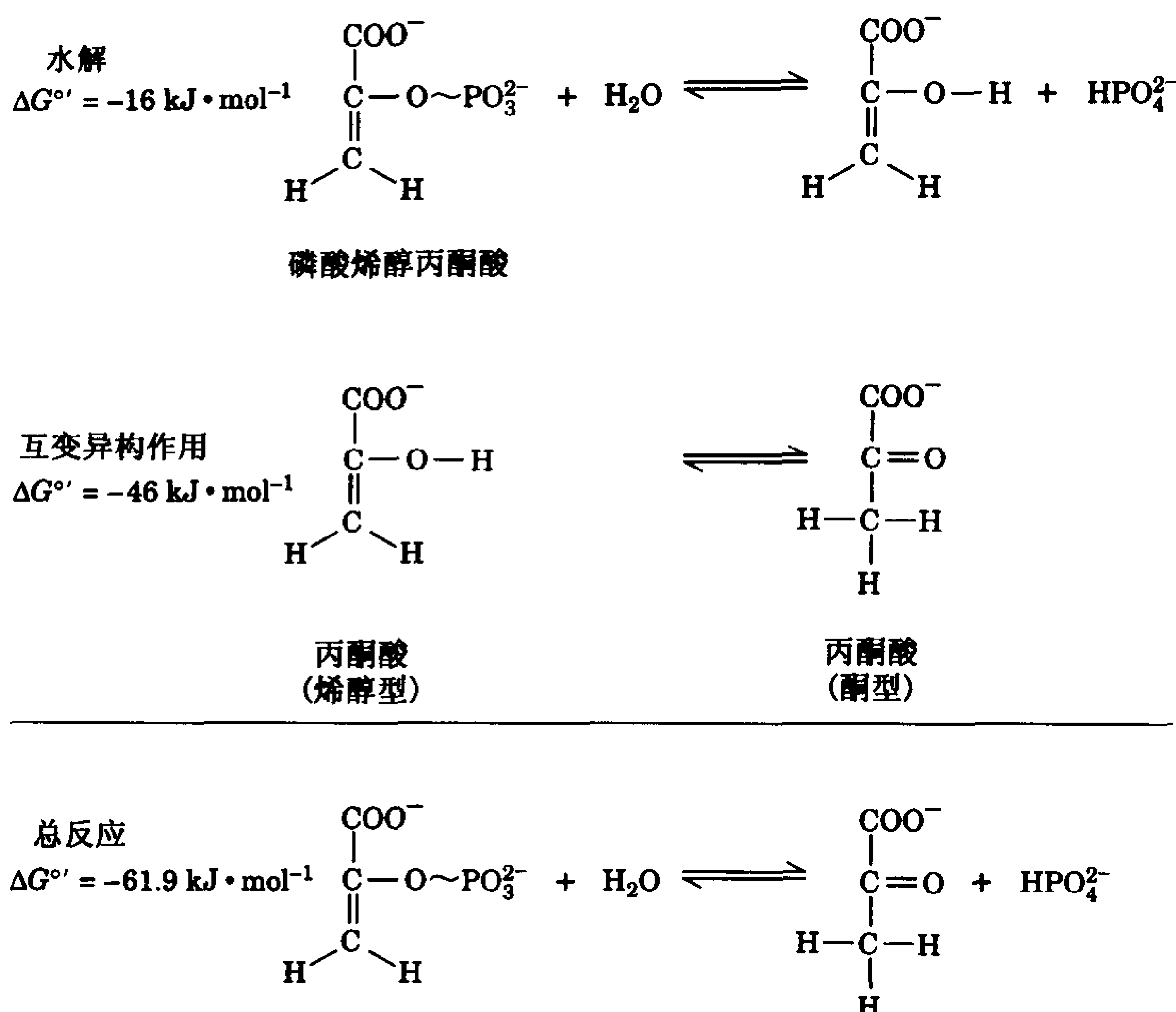
PK 的反应是高度放能的,它提供的能量远超过合成 ATP 所需要的自由能(这是底物水平磷酸化的又一个例子)。在这一点上,烯醇化酶反应的"逻辑性"变得很清楚。2PG 水解的标准自由能只有 $-16kJ\cdot mol^{-1}$,这对驱动 ADP 合成 ATP 是不够的($\Delta G^{\circ\prime}=30.5\ kJ\cdot mol^{-1}$)。然而 2PG 脱水所形成的一个"高能"化合物就能进行这种合成了。PEP 磷酸基转移的高潜势反映了从烯醇式丙酮酸转变为它的酮型互变异构体时自由能的大量释放。考虑到 PEP 水解是一个两步反应(图 14-14)。互变异构这一步提供了比从磷酰基团转移这一步更多的自由能。

400

对糖酵解阶段 II 的评价

糖酵解第一阶段的能量投资(消耗二个 ATP)在糖酵解的第二阶段得到了双倍的回报。因为 2 个磷酸化的 C3 单位转变为 2 个丙酮酸时,偶联合成了 4 个 ATP。这个过程表示在图 14-15 的图解中。

如同我们已看到的糖酵解的总反应是:



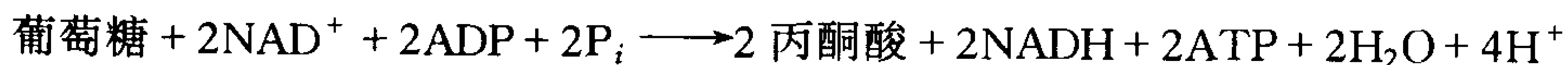


图 14-14 PEP 的水解

反应可以分为两步,水解和互变异构。总的 $\Delta G^{\circ\prime}$ 比从 ADP 和 P_i 合成 ATP 所需要的 $\Delta G^{\circ\prime}$ 大得多。

$$\text{葡萄糖} + 2NAD^+ + 2ADP + 2P_i \longrightarrow 2\ \text{丙酮酸} + 2NADH + 2ATP + 2H_2O + 4H^+$$

现在让我们来看看糖酵解 3 个产物中的每个产物。

1) **ATP** 在第 I 阶段,每个葡萄糖的起始 2 分子 ATP 的投入以后通过底物水平的磷酸化反应产生了 4 个 ATP(通过第 II 阶段每个 GAP 产生 2 个 ATP)。每个葡萄糖净得 2 个 ATP。在某些组织和生物中葡萄糖是初级的代谢燃料,通过糖酵解可以满足大多数细胞的能量需求。 401

2) **NADH** 葡萄糖通过糖酵解途径的降解过程被氧化。2 个 NAD^+ 被还原成 2 个 NADH。如节 13-3C 中论述的,还原型辅酶,如 NADH 代表自由能的来源,可在以后的氧化作用中被回收。在有氧条件下,在被称为**电子传递**(electron transport)的过程中(节 17-2),电子从还原型辅酶经过一系列电子载体传给最后的氧化剂 O_2。电子传递中的自由能驱动了 ADP 合成 ATP(氧化磷酸化;节 17-3)。在需氧生物中,这一顺序事件也用来再生氧化型 NAD^+,从而可参加 GAPDH 介导的又一轮催化反应。在无氧状态下,NADH 必须通过其他途径再氧化,为保持糖酵解途径的进行(节 14-3)提供 NAD^+。

3) **丙酮酸** 每个葡萄糖分子通过部分氧化产生 2 分子丙酮酸,丙酮酸仍然是相对还原性的分子。在有氧条件下,通过柠檬酸循环(第 16 章),丙酮酸的碳原子完全氧化为 CO_2。通过这个过程释放的能量驱动合成的 ATP,远远多于葡萄糖仅通过糖酵解途径的有限氧化所产生的 ATP。在无氧代谢中,丙酮酸被代谢生成 NAD^+ 的程度更小,我们将在下面的章节中谈到。

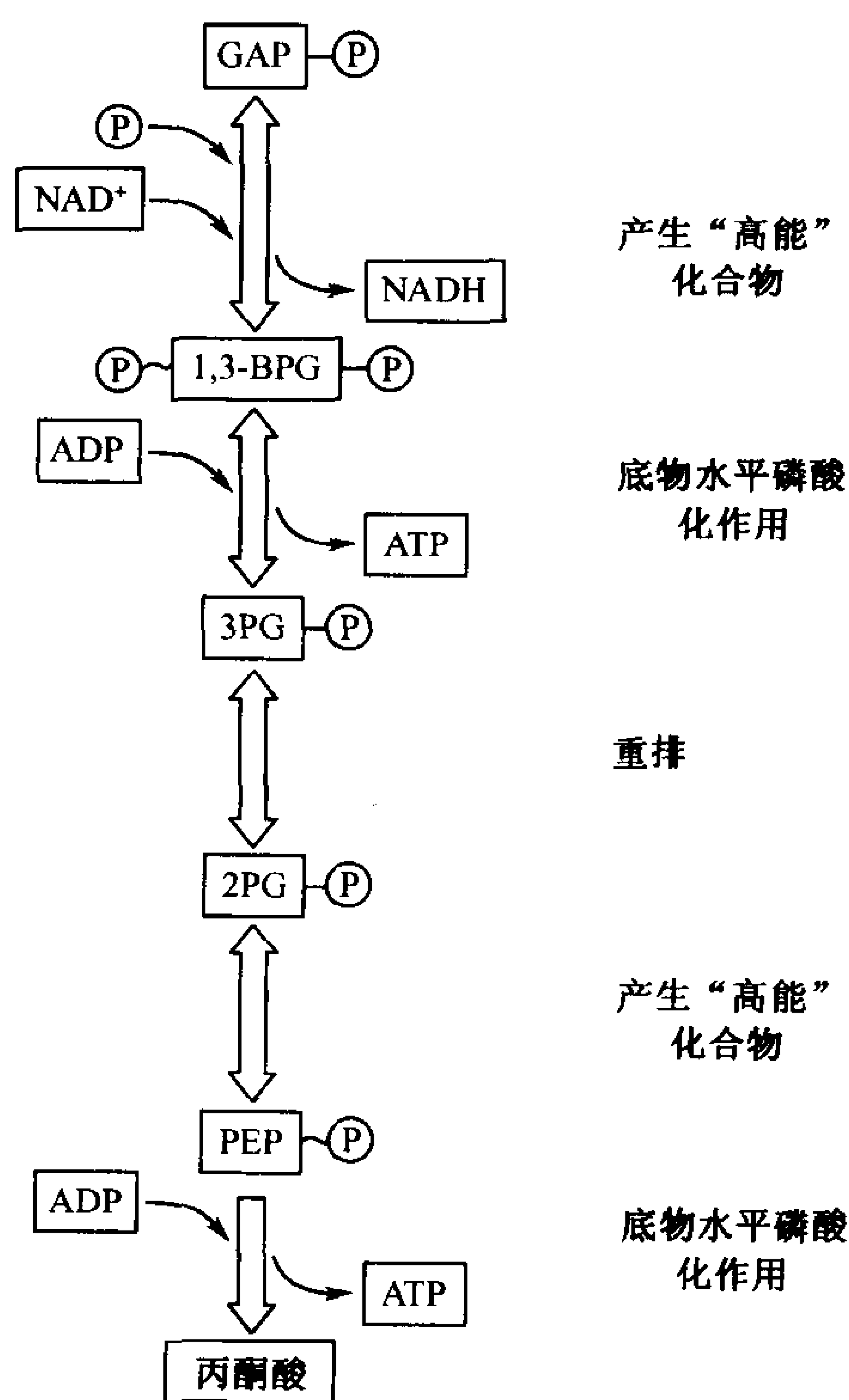


图 14-15 糖酵解第二阶段的示意图解

在这一系列反应中，GAP 进行磷酸化和氧化，随后分子重排，使二个磷酸基团具有足够的自由能转移到 ADP 上产生 ATP。进入糖酵解第一阶段的每分子葡萄糖就有 2 分子 GAP 转变为丙酮酸。

3. 发酵：丙酮酸在无氧条件下的命运

糖酵解中产生的丙酮酸有 3 种代谢命运，概括如图 14-16：

1）在有氧条件下，丙酮酸通过三羧酸循环完全氧化为 CO_2 和水。

2）在无氧条件下，丙酮酸必须转化为还原态的终产物，以便使 GAPDH 反应产生的 NADH 重新氧化，这可以有二条途径：

(a)在酵母中，丙酮酸被脱羧基产生 CO_2 和**乙醛**(acetaldehyde)，然后被 NADH 还原生成 NAD^+ 和乙醇。这个过程被称为**乙醇发酵**(alcoholic fermentation)(发酵是一个无氧的生物反应过程)。

(b)肌肉在无氧条件下，丙酮酸被还原成**乳酸**(lactate)，使 NAD^+ 再生，这一过程称为**同型乳酸发酵**(homolactic fermentation)。

因此，在有氧糖酵解中，NADH 作为一个“高能”化合物；而在无氧糖酵解中，氧化作用产生的自由能以热能的形式被浪费了。

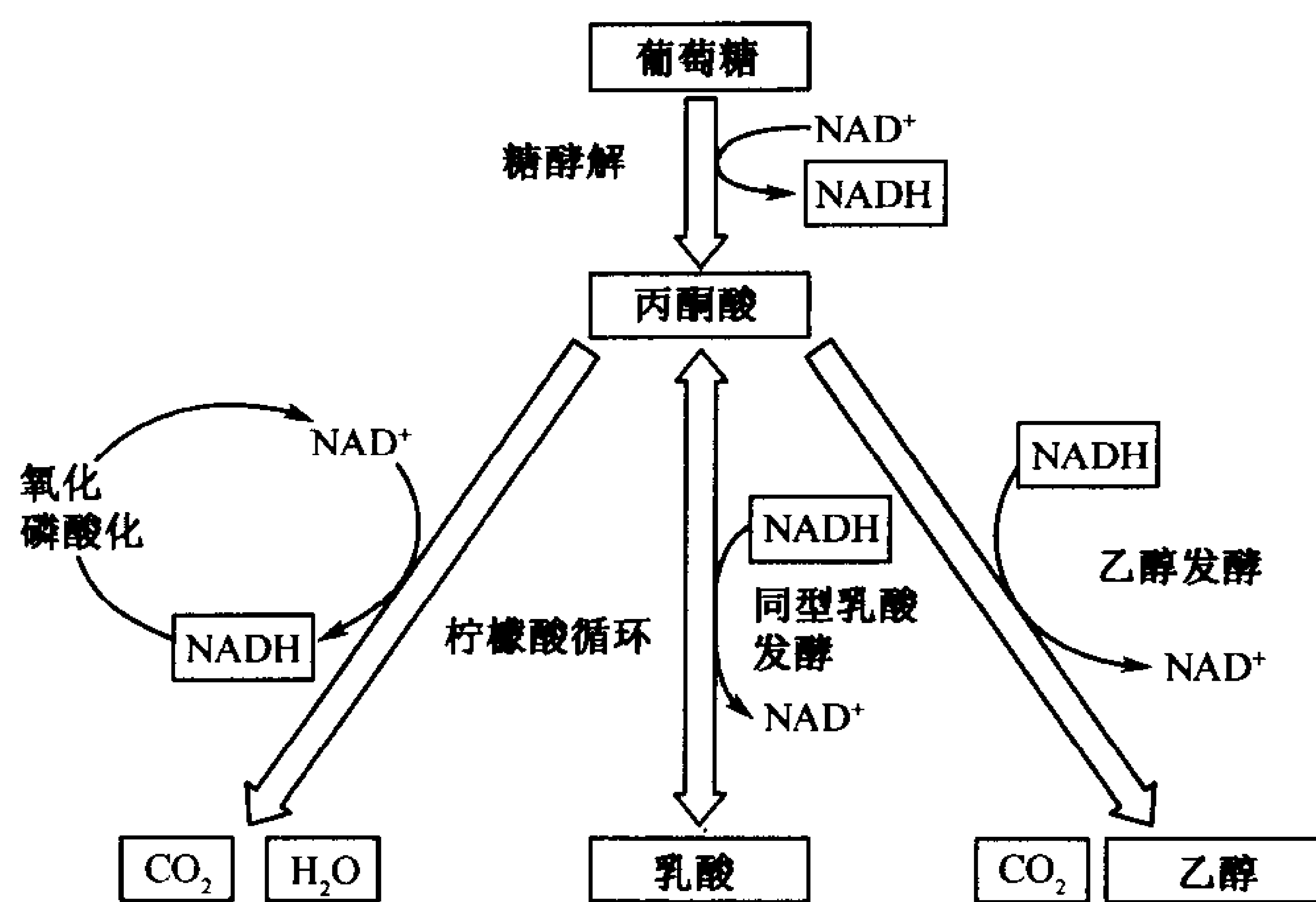
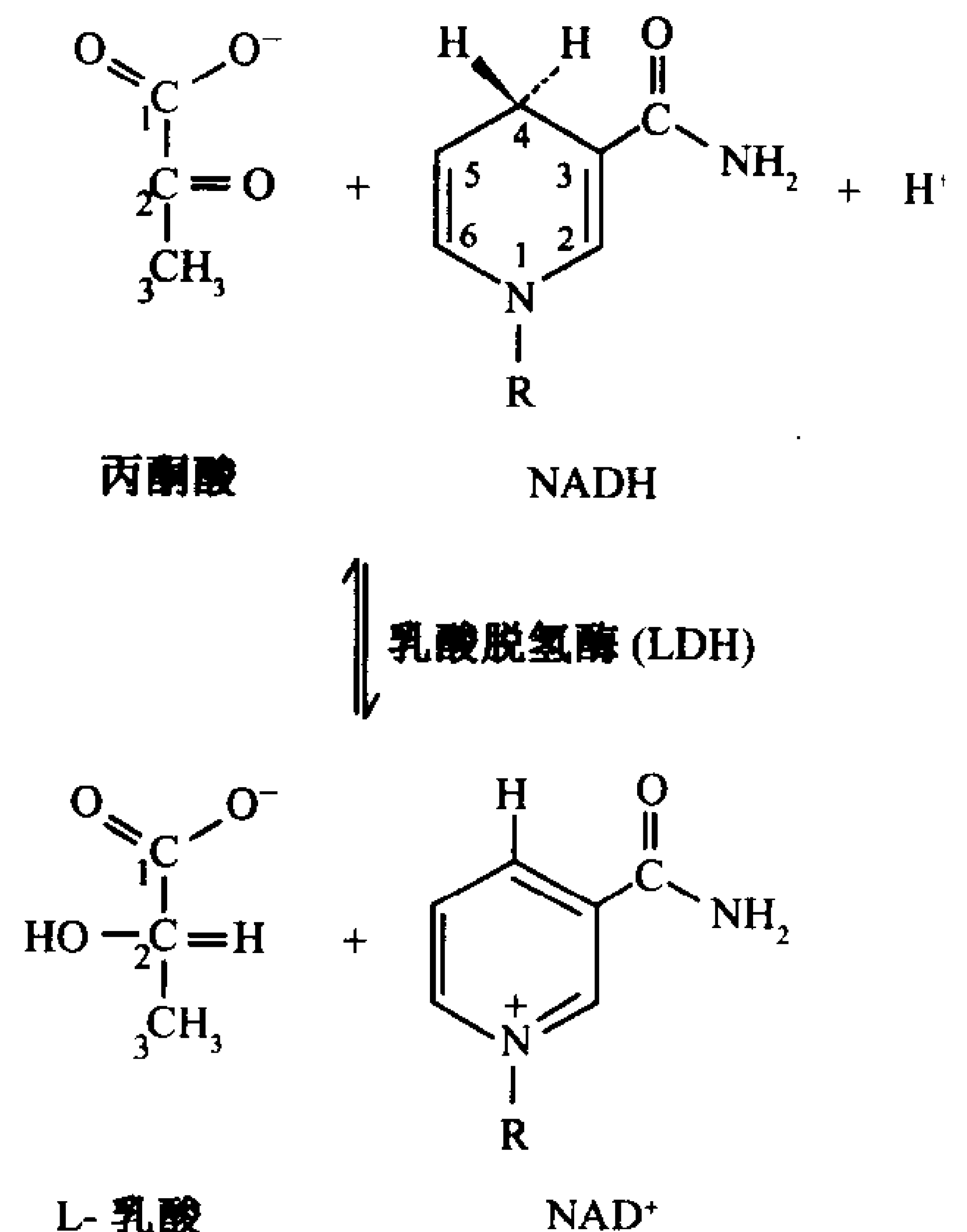


图 14-16　丙酮酸的代谢命运

在有氧条件下(左边),丙酮酸通过柠檬酸循环,碳原子全部氧化为 CO_2。电子则通过氧化磷酸化的传递最终生成 H_2O。在无氧条件下如在肌肉中,丙酮酸可逆的转变为乳酸(中间),在酵母中则转变为 CO_2 和乙醇(右边)。

A. 同型乳酸发酵

在肌肉中,特别是在激烈活动时,需要大量 ATP,而氧的供应短缺,乳酸脱氢酶(LDH)催化丙酮酸对 NADH 的氧化产生 NAD^+ 和乳酸(见右图)。这一反应常被归为糖酵解反应 11。*乳酸脱氢酶反应是完全可逆的,所以丙酮酸和乳酸的浓度很快达到平衡。*



丙酮酸被 LDH 还原的设想机制是一个氢阴离子立体专一性地从 NADH 的 C4 上转移到丙酮酸的 C2 上,伴随着一个质子从 His 195 的咪唑基上转移过来。His 195 和 Arg 171 两者与底物羧基间的静电相互作用,使丙酮酸(在逆反应中为乳酸)定位在酶的活性中心。

403

在肌肉中无氧糖酵解的总过程可表示为:



$$\text{葡萄糖} + 2ADP + 2P_i \rightarrow 2\ \text{乳酸} + 2ATP + 2H_2O + 2H^+$$

乳酸代表了葡萄糖无氧代谢的一类终产物。乳酸可以从细胞中被运走,或者又转变回丙酮酸。在骨骼肌细胞中产生的许多乳酸可被血液带到肝脏,在肝脏中通常被用来合成葡萄糖(节 21-2A)。

与一般持有的观点相反,并非乳酸在肌肉中的积聚造成肌肉疲劳和酸痛,而是因为肌肉中堆积了酵解中产生的酸(高浓度乳酸下,只要 pH 保持正常,肌肉仍可保持它的工作负荷)。

B. 酒精发酵

酵母在无氧条件下,糖酵解过程中的 NAD^+ 可以被再生,丙酮酸则被转变为乙醇和 CO_2,这

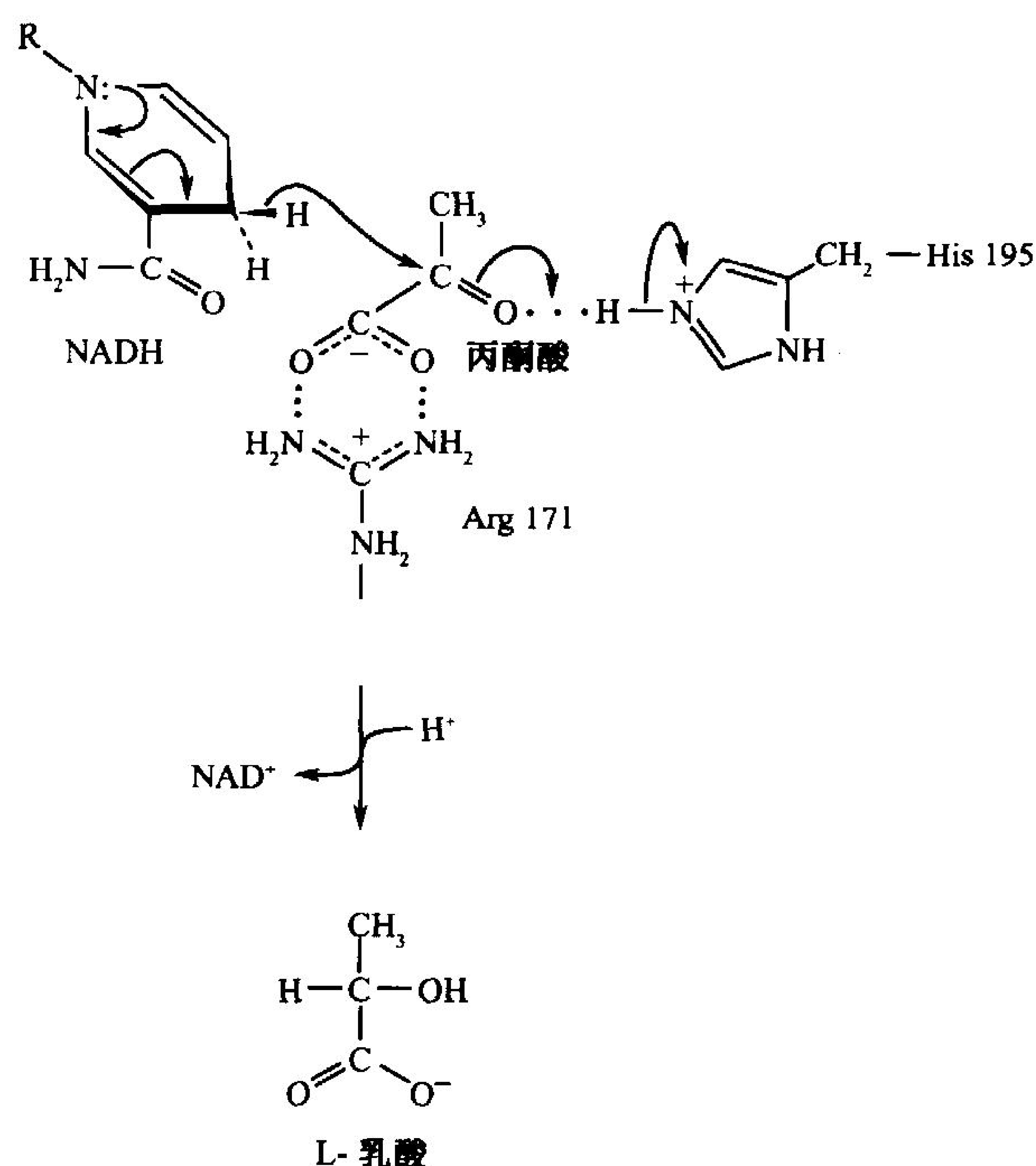




图 14-17 酵母细胞的电镜照片
(引自生物摄影学会的摄影研究者)

个过程已经被利用了几千年。当然,乙醇是酒和提神饮料中的活性成分,产生的 CO_2 发酵面包。

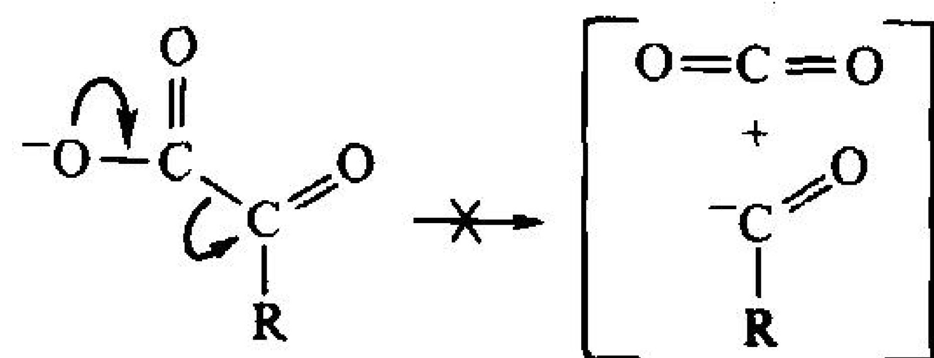
酵母(图 14-17)通过二个连续的反应(图 14-18)产生乙醇和 CO_2:

1) 丙酮酸脱羧基生成乙醛和 CO_2,这是被**丙酮酸脱羧酶**(pyruvate decarboxylase,在动物中不存在的一种酶)所催化的。
2) 乙醛被 NADH 还原为乙醇,这是被乙醇脱氢酶所催化(节 11-1B)。产生的 NAD^+ 被糖酵解的 GAPDH 反应所用。

TPP 是丙酮酸脱羧酶的一个必要的辅因子

丙酮酸脱羧酶含有辅酶**硫胺素焦磷酸**(TPP;也称**硫胺素二磷酸**,ThDP)。TPP 与丙酮酸脱羧酶紧密但非共价地结合(图 14-19)。

酶利用 TPP,因为 α-酮酸如丙酮酸的非催化性脱羧要求在羰基碳原子上构成一个负电荷的过渡态,一个不稳定的状态(左图)。这个过渡态可以通过形成中的负电荷的移位,进入一个合适的"电子槽"而得以稳定。蛋白质的氨基酸残基的这种功能是很弱的,但 TPP 却很容易做到。



TPP 的催化活性功能基团是**噻唑环**(thiazolium ring),这个基团的 C2-H 原子是相对酸性的,这是因为它和正电性的四价氮原

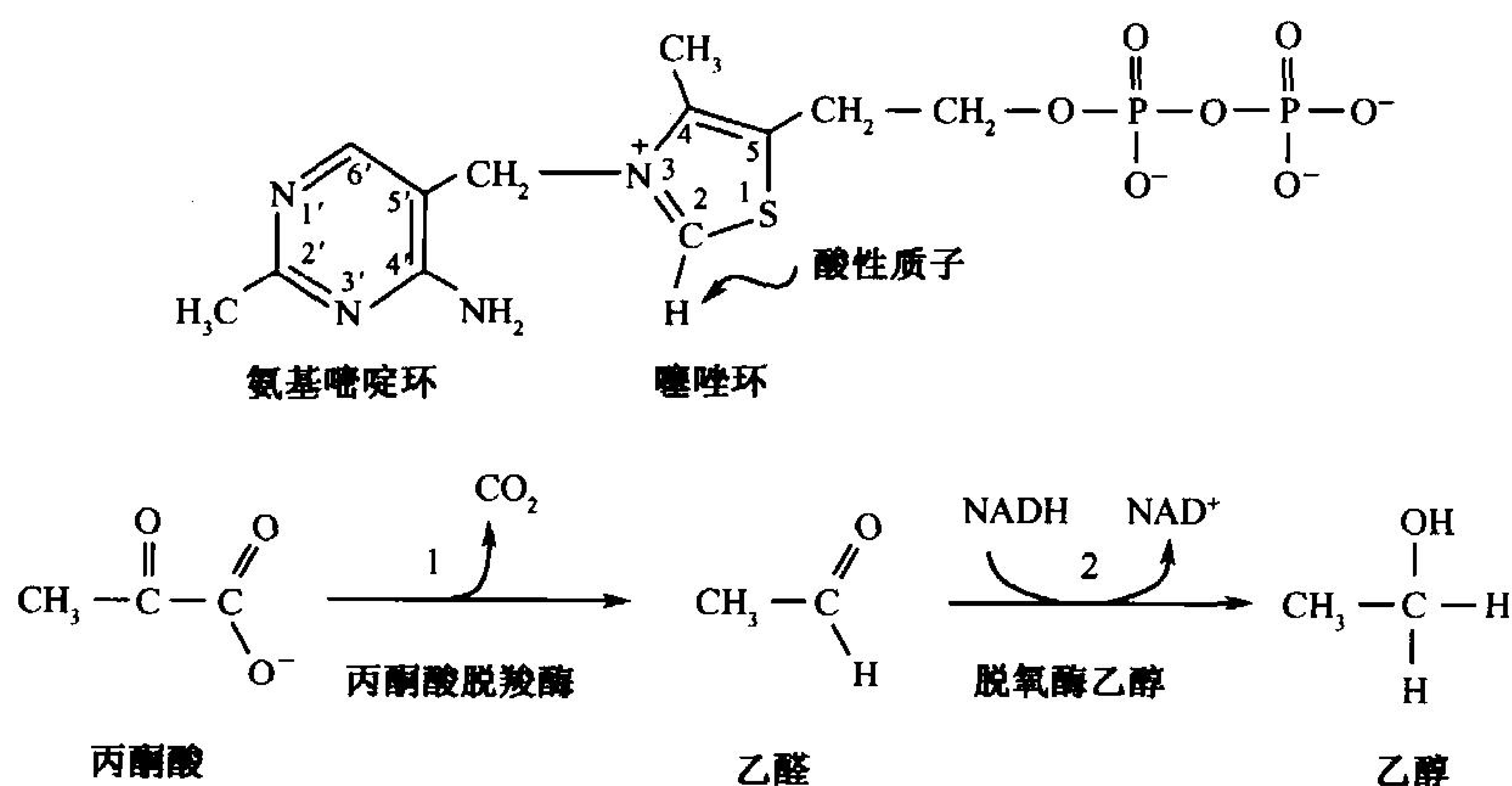


图 14-18 酒精发酵的两个反应

(1) 丙酮酸脱羧形成乙醛。(2) 乙醛被 NADH 还原为乙醇。

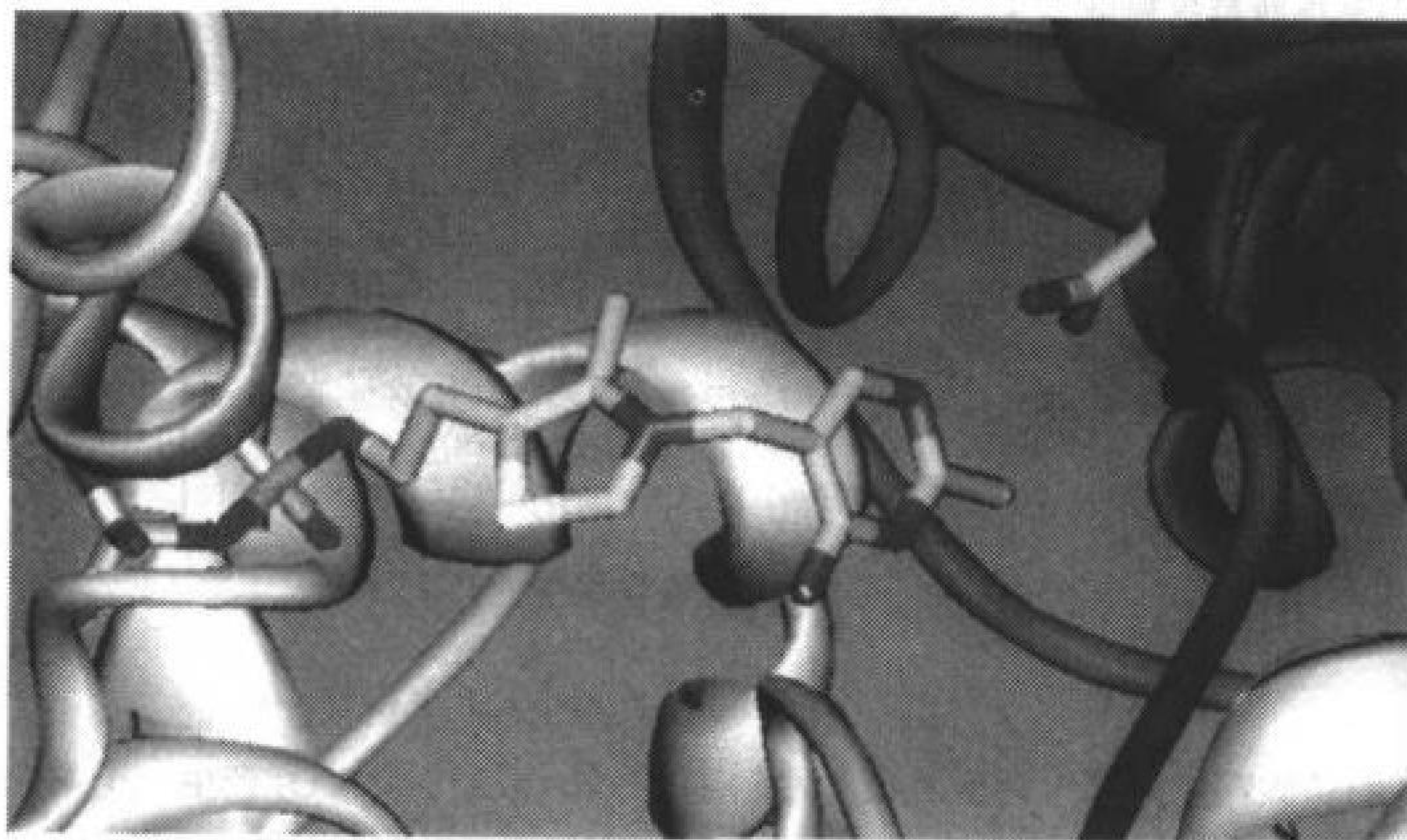


图 14-19 TPP 与 *Saccharomyces uvarum*(酿酒酵母)的丙酮酸脱羧酶结合

TPP 和 Glu 51 的侧链以骨架形式表示,绿色表示 C,蓝色为 N,红色为 O,黄色为 S,橘黄为 P。TPP 和座落于二聚体两个亚基间(花青色和洋红色)的腔相结合。在腔中 TPP 与 Glu 51 形成氢键。(引自 William Furey and Martim Sax 的 X 射线结构,匹兹堡大学和畜牧部医学中心)

子在位置上很靠近,当质子解离时,它的静电可以稳定负碳离子的形成,这种偶极负碳离子(或 ylid)是辅酶的活性形式。丙酮酸脱羧酶的作用如下(图 14-20):

步骤 1:TPP 的负碳离子形式对丙酮酸的羰基碳发起亲核攻击。

步骤 2:CO_2 的去除产生了一个共振稳定的负碳离子加合物,其中辅酶的噻唑环的作用就像一个电子槽。

步骤 3:负碳离子的质子化。

步骤 4:去除 TPP 的负碳离子形成乙醛和活性酶的再生。

此机制由于**羟乙基硫胺素焦磷酸**(hydroxy ethylthiamine pyrophosphate)中间物的分离而得到证实。

脚气病是一种硫胺素缺乏症

TPP 的噻唑环具有与羰基加合的能力及作为电子槽的作用,成为大多数 α-酮酸脱羧基作用

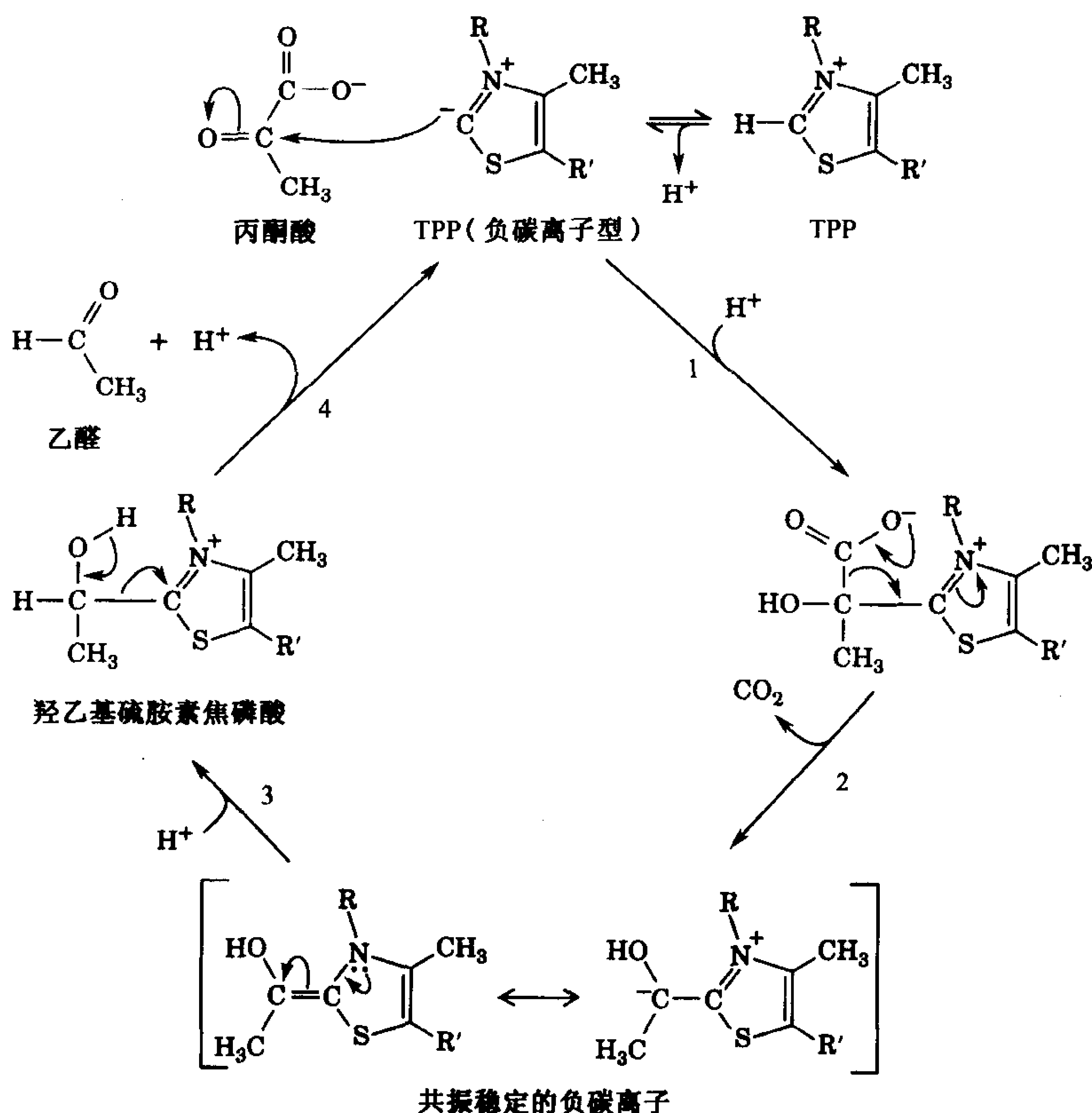
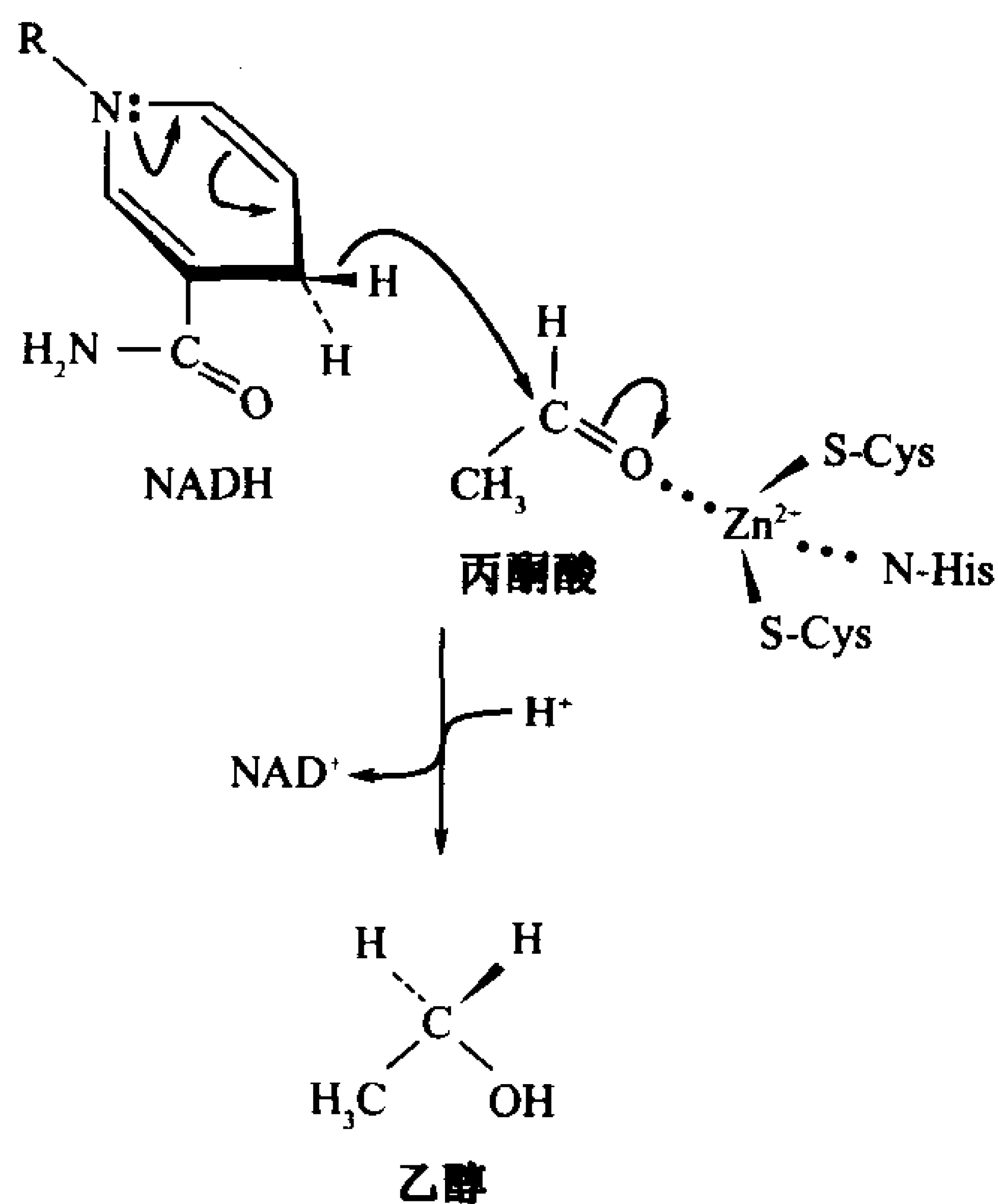


图 14-20 丙酮酸脱羧酶的反应机制

(1)TPP 的负碳离子形式对丙酮酸羰基发起亲核攻击。(2)去除 CO_2 产生一个共振稳定的负碳离子；(3)负碳离子的质子化；(4)除去 TPP 的负碳离子，产物释出。

的辅酶。大多数脊椎动物的组织既不能合成硫胺素(**维生素 B_1**)亦没有足量的储存，必须从每天的膳食中供应。人类缺乏硫胺素的最终致命性结果是知名的**脚气病**(beriberi)。它的特征是由于神经紊乱引起四肢疼痛、麻痹和萎缩(消耗性的)，和(或)由于心脏衰竭而导致水肿(组织和体腔积液)。脚气病在食用大米的亚洲地区特别流行，这是因为习惯上研磨主食用谷物，去除了它的富含硫胺素的外皮。脚气病还频频地发生在慢性嗜酒者中，这是因为他们饮酒的嗜好而不进食。

405



乙醛的还原和 NAD^+ 的再生

酵母乙醇脱氢酶(YADH)，催化乙醛转变为乙醇。该酶是一个四聚体，每个亚基结合一个 Zn^{2+}，Zn^{2+} 可以极化乙醛的羰基，使反应过渡态中出现的负电荷稳定化(见左图)，有利于 NADH 上的氢立体专一地转移给乙醛(节 11-1B)。

哺乳动物肝脏的乙醇脱氢酶(**LADH**)既可代谢肠道细菌无氧代谢产生的乙醇,也可代谢外源乙醇(乙醇脱氢酶反应的方向,因乙醇和乙醛的相对浓度而异)。哺乳动物的 LADH 是一个二聚体,与 YADH 氨基酸序列有明显的相似性。每个单体有二个结合的 Zn^{2+},但只有其中一个的功能像酵母乙醇脱氢酶。

C. 发酵的能量学

热力学容许我们分解发酵过程的组成部分,并说明它们的自由能变化。这使我们能计算葡萄糖降解代谢中用于合成 ATP 的自由能的效率。对同型乳酸发酵而言,



$$\text{葡萄糖} \longrightarrow 2\ \text{乳酸} + 2H^+ \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -196\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

对乙醇发酵而言,



$$\text{葡萄糖} \longrightarrow 2CO_2 + 2\ \text{乙醇} \qquad \Delta G^{\circ\prime} = -235\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

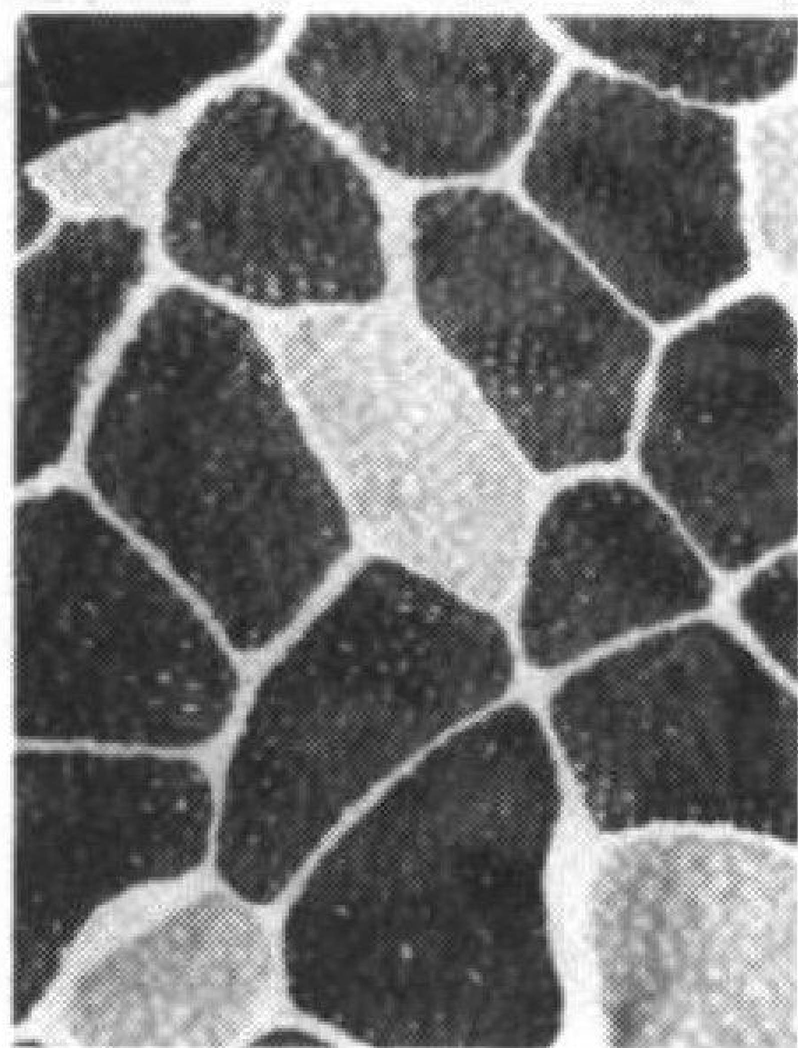
框 14-2　生物化学焦点

肌肉中糖酵解 ATP 的产生

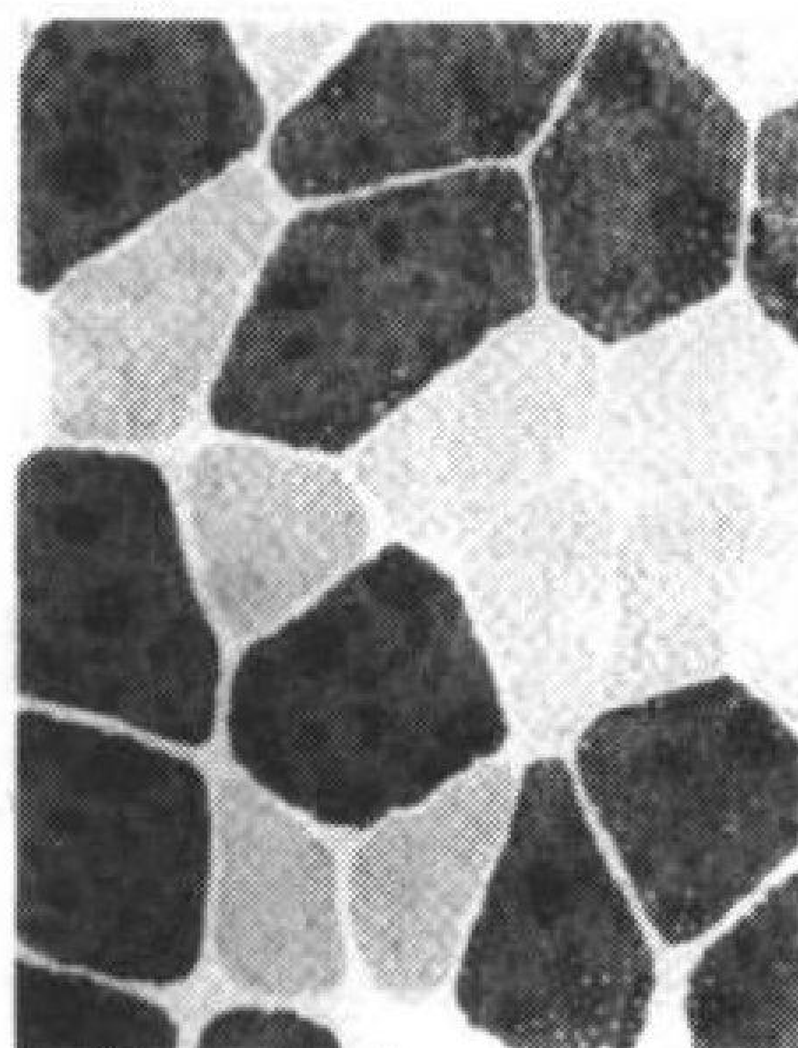
骨骼肌含有慢收缩(I 型)和快收缩(II 型)两类纤维。所以被称为快收缩纤维,是因为它们大都在肌肉中能短时间内爆发出快速活动,而几乎不需要线粒体(氧化磷酸化发生的地方)。因而,它们必须通过无氧酵解得到几乎全部的 ATP,为此它们具有特别大的无氧酵解能力。与此相反,有些肌肉可以缓慢而持久地收缩,它们富含慢收缩纤维,纤维中富含线粒体,它们的大部分 ATP 都得自氧化磷酸化。

快和慢收缩纤维原被称为白色和红色纤维,白色肌肉组织如富含线粒体则呈现红色,这是细胞色素中含有血红素的特征。然而,颜色只是肌肉生理学的一个不完美的指标。

一个熟知的例子是候鸟,如野鸭和野鹅用于飞翔的肌肉,它们需要连续不断的能量供应,所以它们富含慢收缩纤维。因此这些飞禽的胸肌是深色的。相反,一些比较温顺的飞禽如鸡和火鸡,它们用于飞翔的肌肉只需要短暂的爆发(常常是为了逃避危险),所以主要含有快收缩纤维,它们的肌肉一般是白色的。至于人类,短跑运动员的肌肉相对地富含快收缩纤维,而长跑运动员则慢收缩纤维的比例较大(虽然他们肌肉的颜色一样)。(引自 J.D. Dougall, Mc Master University, Carada)



慢收缩肌肉纤维



快收缩肌肉纤维

这两个过程每个都偶联生成 2ATP,每消耗一个葡萄糖需要 $\Delta G^{\circ\prime} = +61\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$。ATP 生成的 $\Delta G^{\circ\prime}$除以生成乳酸的 $\Delta G^{\circ\prime}$,表明同型乳酸发酵的效率是 31%;亦即这个过程在标准的生化

状态下，所释放的自由能的 31% 被用于合成 ATP。其余的能量以热的形式消耗了，所以这个过程是不可逆的。与此类似，在标准的生化状态下，乙醇发酵的效率是 26%。*在生理状态下，反应物和产物的浓度与标准状态下差别很大，这些反应的热力学效率都大于 50%。*

和氧化磷酸化相比用葡萄糖进行无氧发酵是极其浪费的，发酵的结果是每个葡萄糖产生 2 个 ATP，而氧化磷酸化每分子葡萄糖可以生成 38 个 ATP(节 17-3C)。这解释了巴斯德的观察，即酵母在无氧条件下生长消耗的糖，远远高于在有氧条件下生长(**巴斯德效应**)。然而，无氧酵解产生 ATP 的速度比氧化磷酸化快 100 倍。因而当组织如肌肉消耗 ATP 很快时，ATP 几乎完全通过无氧酵解再生(同型乳酸发酵并不是真正的“浪费”葡萄糖，因为乳酸可以在肝脏中有氧地转变回葡萄糖(节 21-2A))。有些肌肉已分化为可以快速通过糖酵解产生 ATP(见框 14-2)。

4. 糖酵解的调控

在恒态条件下糖酵解是连续进行的，虽然糖酵解流量必须适应机体的需要而变化。

对给定的途径，例如糖酵解，要阐明其流量控制的机制一般包括 3 个步骤：

1) 通过测定体内每步反应的 ΔG 确定途径中的速度限制步骤。远离平衡工作的酶，往往是潜在的控制点(节 13-1D)。
2) 在体外，鉴别催化限速反应的酶的别位变构修饰剂。这些化合物的作用机制是根据它们对酶动力学的影响而确定的。
3) 在各种条件下测定推测的调节剂的体内水平，以确定它们浓度的变化是否符合推测的调节机制。

407

让我们观察一下肌肉组织中糖酵解的热力学，以了解它的控制机制(记住，不同的组织对糖酵解的控制途径是不同的)。表 14-1 中列出了标准自由能的改变($\Delta G^{\circ\prime}$)和实际上与糖酵解途径每步反应相联系的生理自由能的改变(ΔG)。认识这一点很重要，即标准状态下的反应自由能的改变，可能和体内实际值有显著差别。

表 14-1　心肌糖酵解各步反应的 ΔG 和标准 $\Delta G^{\circ\prime}$

反应	酶	$\Delta G^{\circ\prime}$ /(kJ·mol^{-1})	ΔG /(kJ·mol^{-1})
1	己糖激酶	-20.9	-27.2
2	PGI	+2.2	-1.4
3	PFK	-17.2	-25.9
4	醛缩酶	+22.8	-5.9
5	TIM	+7.9	+4.4
6+7	GAPDH+PGK	-16.7	-1.1
8	PGM	+4.7	-0.6
9	烯醇化酶	-3.2	-2.4
10	PK	-23.0	-13.9

从 Newsholme E. A. 和 Start, C., Regulation in Metabolism, P. 97, Wiley(1973)的数据计算所得。

*在生理条件下，心肌中的糖酵解只有己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶所催化的 3 步反应有大的负自由能改变，糖酵解中的这些非平衡反应都是流量控制点的候选者。*而糖酵解的其

408

他反应是接近平衡的：它们的正向和逆向反应速度比途径中的真实流量要快得多。这些平衡反应对途径中的中间物浓度的变化很敏感的，并很快容纳流量的改变，这些改变均来自糖酵解途径的速度限制步骤。

A. 磷酸果糖激酶：肌肉中糖酵解的主要流量控制酶

己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶的体外研究表明，每个酶都受到各种化合物的控制。当糖酵解以肌糖元作为 G6P 的来源时，它通常与骨骼肌中以葡萄糖为来源不同，是不需要己糖激酶的（节 15-1）。丙酮酸激酶催化的是糖酵解途径的最后一步，因此它不像起始点可以调节整个途径的流量。显然，PFK 是一个精致的调节酶，其作用是远离平衡的。在肌肉中，大多数情况下它是一个主要的糖酵解控制点。

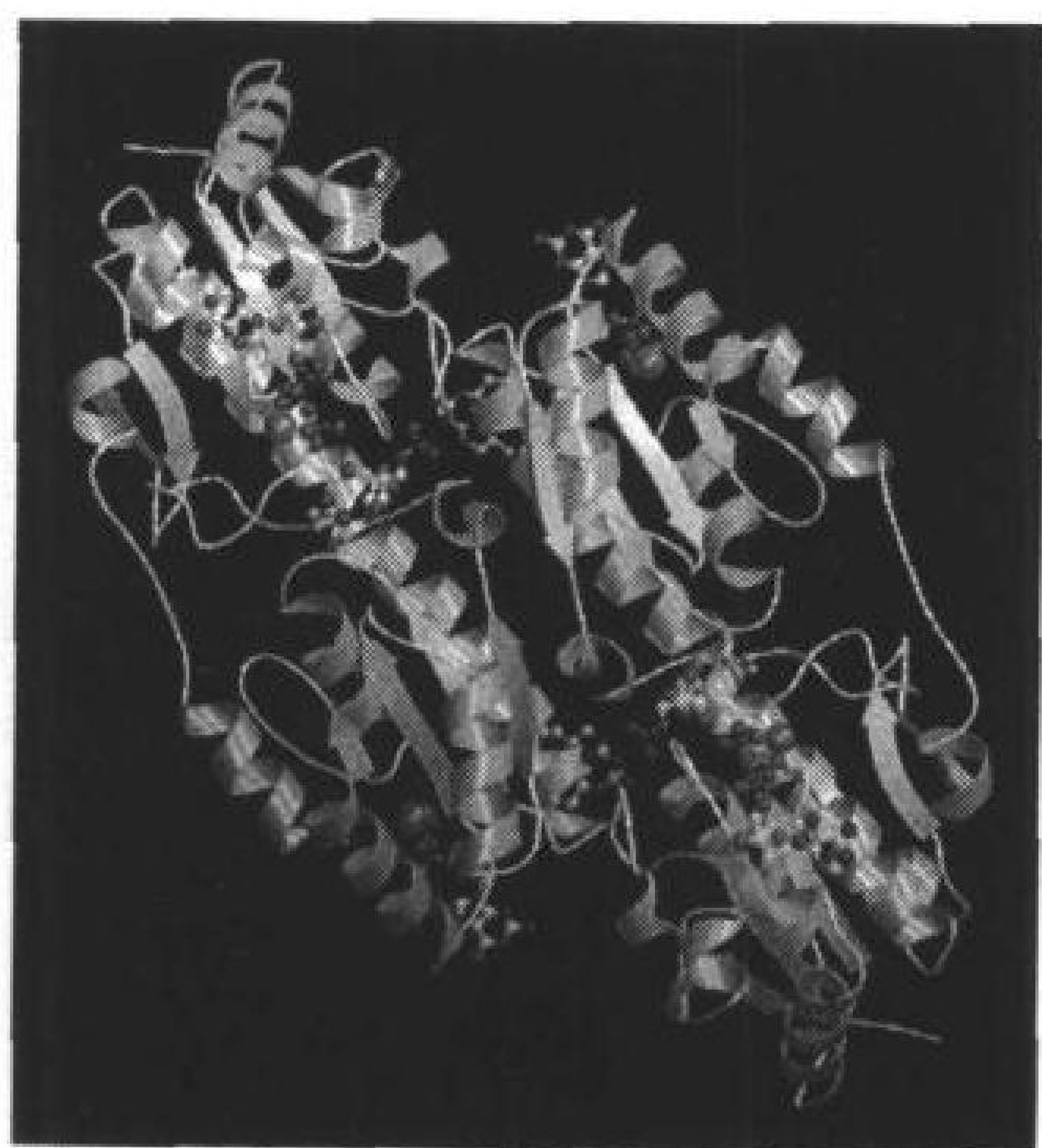


图 14-21　大肠杆菌 PFK 的 X 射线结构
四聚体酶两亚基的带形图，螺旋为粉红色，β 折叠为灰色，余下的链片段以白色表示。每个亚基与它的底物 F6P（在每个亚基的接近中心处）、Mg^{2+}-ATP（右边的下面和左边的上面，绿球代表 Mg^{2+}）结合，以及和激活剂 Mg^{2+}-ADP 结合（右边上面和左边下面，在后面）。（引自 Philip Evans, Cambridge 大学）

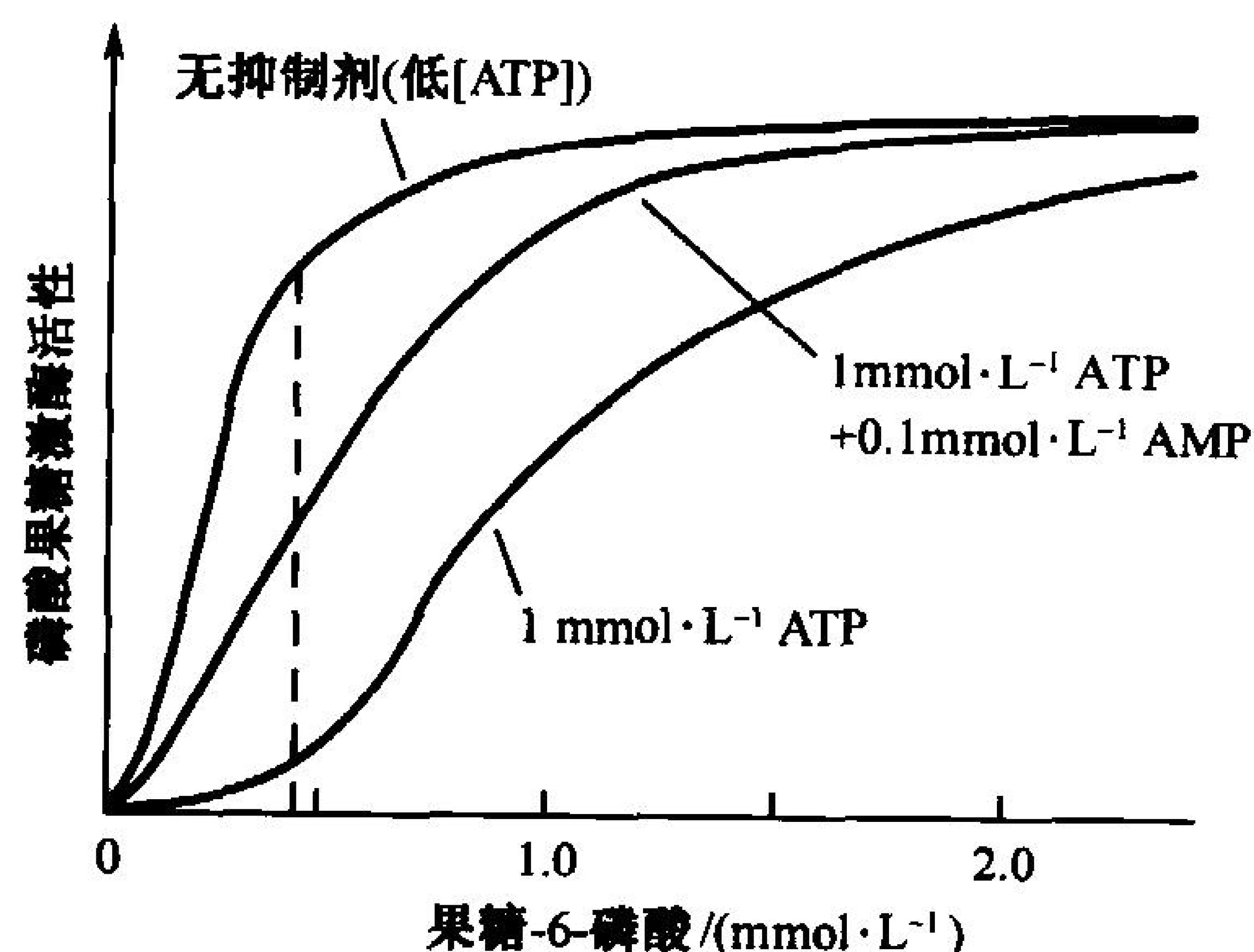


图 14-22　PFK 活性对 F6P 浓度作图
各种条件如下：紫色，无抑制剂或激活剂；绿色，$1mmol \cdot L^{-1}$ ATP；红色为 $1mmol \cdot L^{-1}$ATP + $0.1mmol \cdot L^{-1}$ AMP。[引自 Mansour, T.E. and Ahlfors, C.E., *J. Biol. Chem*. 243, 2523－2533(1968)]

PFK（图 14-21）是一个四聚体酶，有二种构象 R 和 T，处在平衡状态。ATP 既是底物又是磷酸果糖激酶的别位抑制剂。其他化合物包括 ADP、AMP 和**果糖-2,6-二磷酸**（F2,6P）可以逆转 ATP 的抑制效应，所以被认为是激活剂。每个 PFK 亚基有两个 ATP 结合位点：一个是作为底物的结合位点，另一个是作为抑制剂的位点。底物结合位点与 ATP 的结合，两种构象结合得一样好，但是抑制剂结合位点与 ATP 的结合只能是酶在 T 构象时。而 PFK 的另一个底物 F6P 则与 R 构象优先结合，因而高浓度 ATP 与 T 构象结合时它的作用就像 PFK 的别构抑制剂，使 T $\rightleftharpoons$ R 的平衡趋向于 T 构象，从而降低了 PFK 与 F6P 间的亲和力（这和 2,3-BPG 降低血红蛋白与 O_2 亲和力的作用很相似；节 7-2C）。在图解中，在高浓度 ATP 下，PFK 活力对 F6P 作图，从双曲线（非协同性）转变为 S 形（协同性），这就是别位酶的特征（图 14-22）。例如，当 [F6P] = $0.5mmol \cdot L^{-1}$（图 14-22 中的虚线）时，接近于酶的最高活力，但当有 $1mmol \cdot L^{-1}$ ATP 存在时，活

力降低到起始水平的 15%，降低了将近 7 倍(事实上 PFK 的最有效的别构抑制剂是 F2,6P，这将在节 15-4C 中讨论)。

磷酸果糖激酶别构效应的结构基础

Philip Evens 曾测定了几种生物的 PFK 的 R 和 T 构象的 X 射线结构，PFK 的 R 构象与底物 F6P 结合后是稳定的。在 *Bacillus stearothermophilus* PFK 的 R 构象中，162 位 Arg 侧链可与另一个亚基的活性中心结合的 F6P 的磷酸基形成一离子对(图 14-23)。162 位 Arg 是位于一个螺旋圈的末端，当转变为 T 构象时螺旋解开，162 位 Arg 的正电荷侧链因此摆开，被 161 位 Glu 的负电荷侧链取代，结果 F6P 的双倍负电性的磷酸基大大减弱了与 T 构象酶的亲和力。螺旋圈的解开是 R→T 转换所必需的，它的解开受到激活剂 ADP 与酶的效应剂位点的结合所阻碍。猜测 ATP 只能在螺旋圈解开时(T 构象)才能与之结合。

409

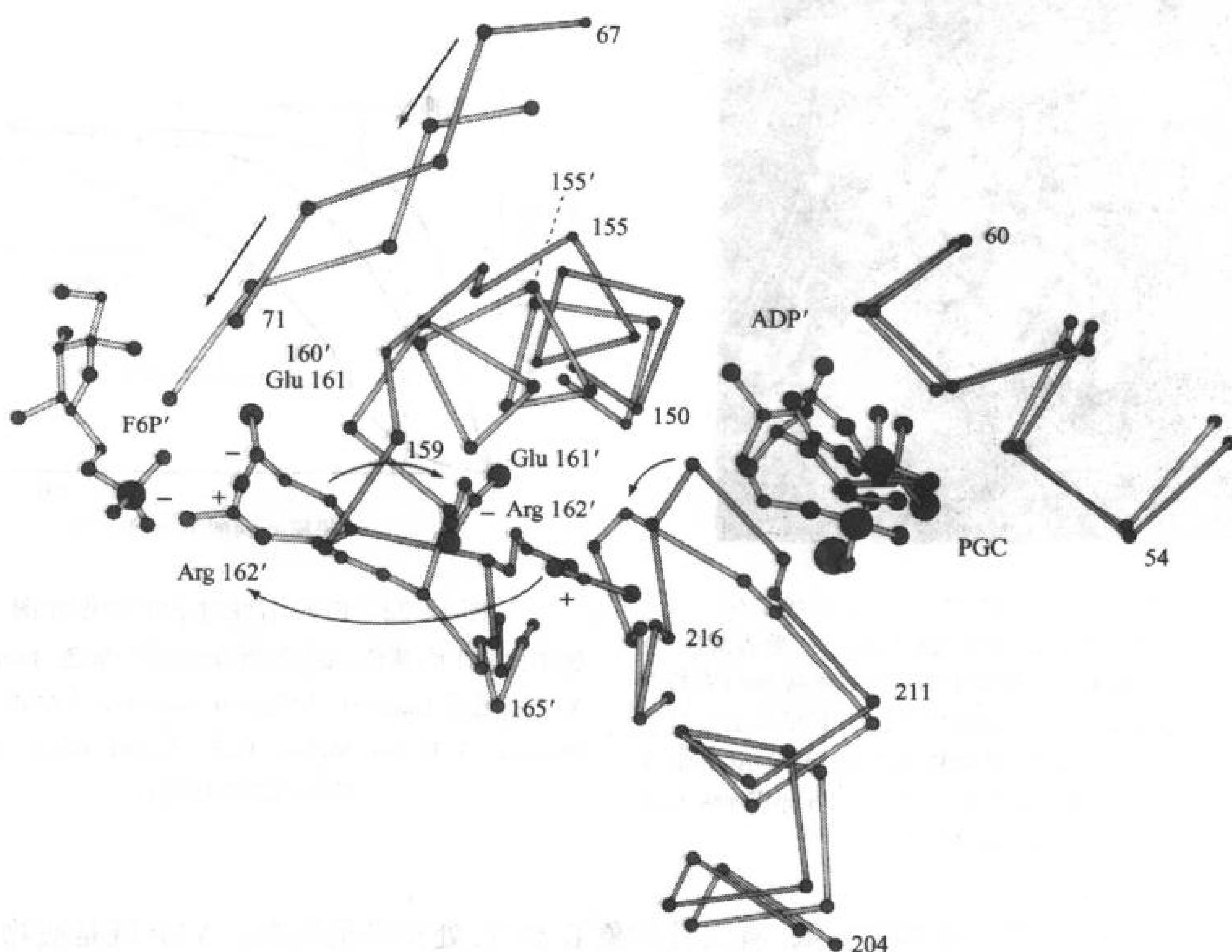


图 14-23 *Bacillus stearotheomophilus* PFK 的别构改变

T 构象(蓝色)片段叠加在 R 构象(红色)片段上。T→R 的别构过渡经由大的构象重排(用箭头指出)。R 构象的残基位数标以符号“′”。注意在 R 状态 Arg 162′和 F6P′形成相吸引的离子相互作用，而在 T 状态时 F6P′被 Glu 161 排斥。图中也显示了 T 构象的非生理性抑制剂 2-磷酸乙醇酸(PGC；PEP 的类似物)以及 R 构象的协同性底物 F6P 和激活剂 ADP 的结合。[引自 Schirmer, T and Evans, P.R., Nature 343, 142(1990)]

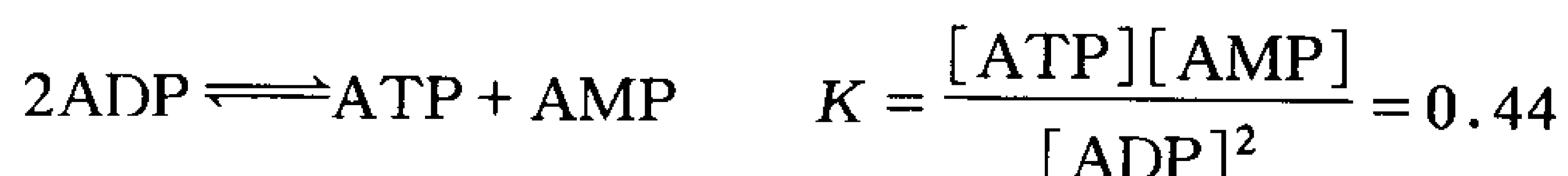
AMP 克服 ATP 对 PFK 的抑制作用

ATP 对 PFK 的直接的别构调节表面上看是一种控制糖酵解流量的方法。当代谢需求低，结果[ATP]较高时，PFK 活性被抑制，通过糖酵解的流量也是很低的；反之，当[ATP]低时，通过途径的流量高，则 ATP 被合成以充实 ATP 库。考虑到 ATP 浓度的生理性变化，情况必然更为

复杂，通过糖酵解的代谢流量的变化可达 100 倍甚至更多，这决定于代谢对 ATP 需要。然而在不同水平代谢活动下测定体内 ATP 的浓度表明，在休息和激烈运动之间，[ATP]的变化<10%。还没有已知的别构机制能解释一个非平衡反应流量改变了 100 倍，而效应剂浓度却只有 10% 的变化。因此，必然还有其他的机制负责糖酵解流量的控制。

ATP 对 PFK 的抑制作用可以被 AMP 和 ADP 解除，这是由于 AMP 与 PFK 的 R 构象优先结合。如果 PFK 溶液中含有 $1\text{mmol}\cdot L^{-1}$ ATP 和 $0.5\text{mmol}\cdot L^{-1}$ F6P，产生了 $0.1\text{mmol}\cdot L^{-1}$ AMP，PFK 活性从最大活性的 15% 上升到 50%，增加了 3 倍(图 14-22)。 410

从静止状态到激烈运动，ATP 浓度只降低 10%，这是由于两个酶——肌酐激酶和腺苷酸激酶(节 13-2C)缓冲的结果。腺苷酸激酶催化下面的反应：



$$2\text{ADP} \rightleftharpoons \text{ATP} + \text{AMP} \qquad K = \frac{[\text{ATP}][\text{AMP}]}{[\text{ADP}]^2} = 0.44$$

在肌肉收缩中 ATP 水解产生的 ADP 在上述反应中很快与 ATP 和 AMP 平衡。

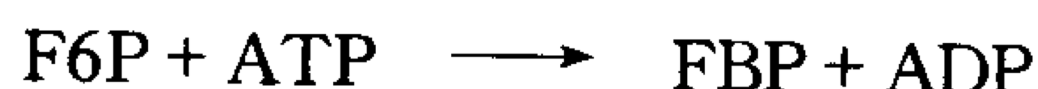
在肌肉中，[ATP]比[AMP]大 50 倍左右，比[ADP]大 10 倍左右。因此，[ATP]的改变，例如从 $1\text{m mol}\cdot L^{-1}$ 变为 $0.9\text{mmol}\cdot L^{-1}$，降低了 10%，结果由于腺苷酸激酶的反应导致[ADP]增加 100% ($0.1\sim0.2\text{mmol}\cdot L^{-1}$)，[AMP]的增加大于 400% ($0.02\sim0.1\ \text{mmol}\cdot L^{-1}$)。因此，由[ATP]降低组成的代谢信号太小，不能解除对 PFK 的抑制作用，但这种信号可以被腺苷酸激酶反应显著地放大，腺苷酸激酶可以使[AMP]增加到一定量，引起 PFK 活性的更大增加。

B. 底物循环

即使像 PFK 这样的精细微调别构机制也只能说明糖酵解流量 100 倍变化中的一部分。回忆节 13-1D 中所述，只有接近平衡的反应能经受流量的很大变化，因为在一个接近平衡的反应中，$v_f - v_r \approx 0$ (v_f 和 v_r 是正向和逆向反应的速度)，因此 v_f 很小的变化就会引起 $v_f - v_r$ 中很大的功能变化。而在 PFK 反应中情况并不是这样，因为在这种不平衡反应中 v_f 是可以忽略不计的。

不管怎样，如果第二个酶催化从产物再生底物的过程在热力学上是有利的，那么这种看似平衡的状态可被认为存在于一个非平衡的反应中。这样相对 v_f 而言，v_r 不再是可忽略不计了。这种状态要求正向(亦即从 F6P 生成 FBP)和逆向过程(即 FBP 断裂为 F6P)通过不同的反应完成，否则就违反热力学的规则(对一个单一的反应，正向和逆向反应不可能同时有利)。

在生理条件下，PFK 催化反应：



$$\text{F6P} + \text{ATP} \longrightarrow \text{FBP} + \text{ADP}$$

这是一个高放能的反应($\Delta G = -25.9\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)。因此，逆向反应与正向反应的速度相比，可以忽略。**果糖-1,6-二磷酸酶**(FBPase)，在许多哺乳动物组织中都存在(它是糖元再生中一个必需的酶；节 15-4B)，它催化放能的 FBP 的水解反应($\Delta G = -8.6\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)： 411



$$\text{FBP} + H_2O \longrightarrow \text{F6P} + P_i$$

注意，PFK 和 FBPase 催化的联合反应结果是 ATP 的净水解：



$$\text{ATP} + H_2O \rightleftharpoons \text{ADP} + P_i$$

这样一组对立的反应被称为底物循环，因为它使底物循环地转变为它的中间物，然后又重新转变回来。当这一组反应被发现时，被视为是一种**无效循环**(futile cycle)，因为它的净结果似乎

是无效地消耗了 ATP。事实上，PFK 的激活剂 AMP 和 F2,6P 别构抑制了 FBPase，这说明在一定条件下，细胞内只有一种酶在工作。然而，现已清楚这两种酶常常同时以有效的速度起作用。

Eric Newsholme 曾经提出底物循环并非完全是“无效”的，而是具有调节功能。*别构调节剂对底物循环相反的二个反应的联合效应，对代谢途径流量（$v_f - v_r$）会产生比通过对单一酶的别构调节作用大得多的分效应。*底物循环并不增加通过途径的最大流量，相反，它起着降低最小流量的作用。从某种意义上讲，底物被置入“把持”状态。在 PFK/FBPase 的例子中（图 14-24），底物循环看来是能量上的“代价”，即肌肉必须付出才能从静止状态（此时 $v_f - v_r$ 很小，底物循环最大），转变为一种持续的高活性状态（此时 $v_f - v_r$ 很大）。底物循环本身的速度可能是在激素或者神经元控制之下，这样才能增加代谢系统在预期的高活动（战斗或飞翔）条件下的敏感性。

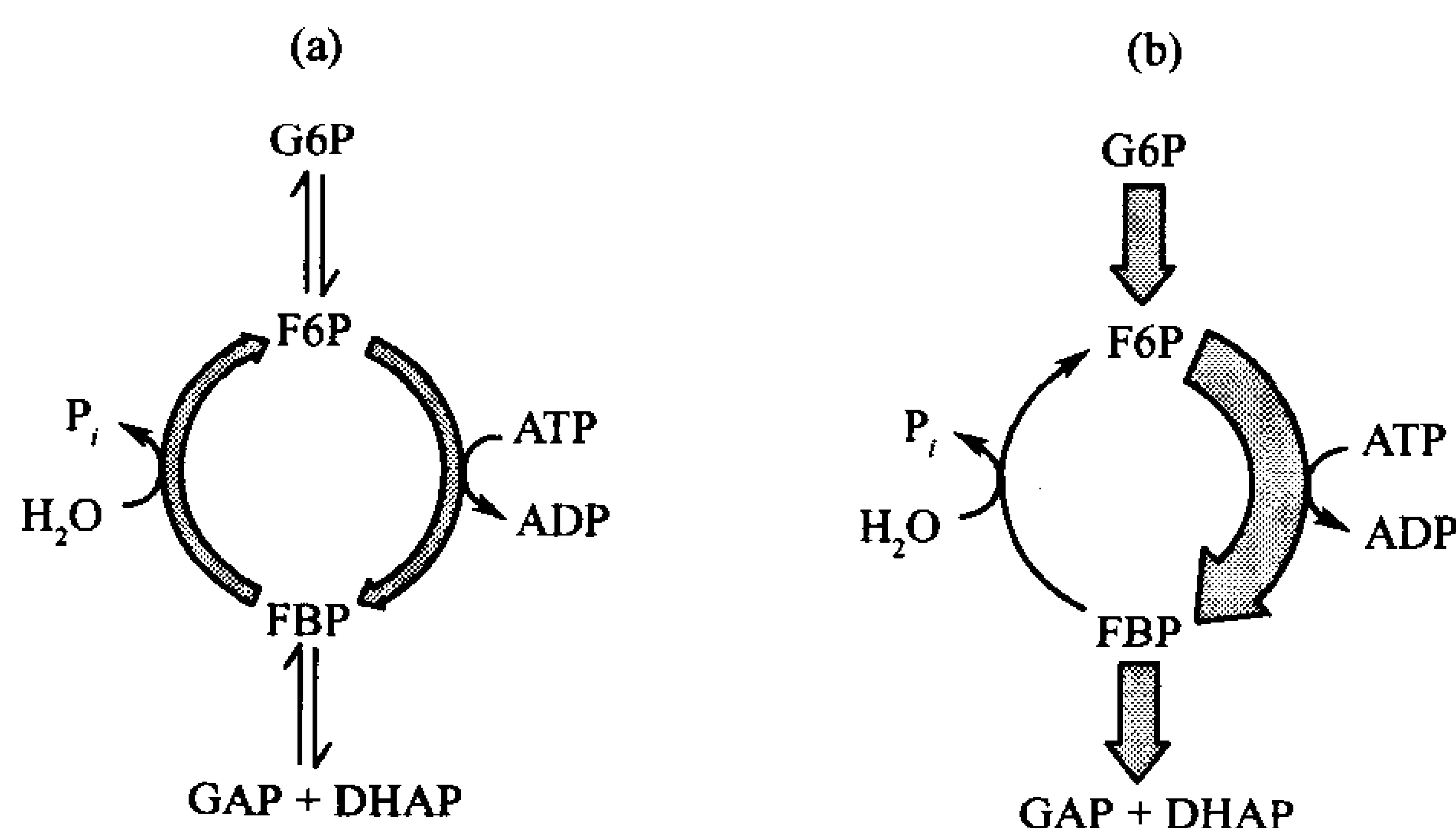


图 14-24 底物循环中 PFK 的调节作用

（a）静止的肌肉中，F6P/FBP 底物循环中的二个酶都是活跃的，糖酵解的流量很低。（b）在活动的肌肉中 FBPase活性降低，而 PFK 的活性增加。通过 PFK 的流量剧烈增加，从而导致糖酵解的高流量。

丙酮酸激酶，其速度有助于控制糖酵解流量的另一个酶，也可被调节 PFK 活性的相同的一些因子别构调节。例如，ATP 降低丙酮酸激酶与其底物的亲和性。此外，丙酮酸激酶是 FBP **前馈激活**（feed-forward activation）的目标，这一机制保证一旦代谢物经过糖酵解的 PFK 步骤，它们将继续走酵解途径。

底物循环、产热和肥胖

412

许多动物，包括成年人都想产生更多的体热，特别当寒冷时，通过肌肉和肝脏的底物循环，这是一个被称为**“非颤抖性生热作用”**（nonshivering thermogenesis，肌肉由于颤抖收缩或任何其他动作产热）。底物循环是受甲状腺素刺激的（在大多数组织中甲状腺素刺激新陈代谢），例如，通过观察，缺少甲状腺功能的大鼠在 5℃ 条件下不能生存。慢性肥胖个体的代谢速度低于正常代谢速度，部分原因可能是由于他们的低非颤抖性产热速度，这种个体倾向于对冷敏感。事实上，正常个体暴露在寒冷中，他们的甲状腺素激活速度会增加，而遗传性肥胖动物和胖人就不会。

5. 葡萄糖以外的己糖代谢

包括葡萄糖在内，己糖如果糖、半乳糖和甘露糖都是重要的代谢燃料，经消化，这些单糖进入血流，被带到各种组织中去。果糖、半乳糖和甘露糖转变为糖酵解的中间物，然后通过糖酵解途径

而代谢(图 14-25)。

A. 果糖

果糖是膳食中一个重要的燃料来源,水果和蔗糖(果糖和葡萄糖的双糖;节 8-2A)中含有大量果糖。果糖的代谢有二条途径,一条发生在肌肉中,另一条发生在肝脏中,这种双路代谢是因为这些组织中存在着不同的酶。

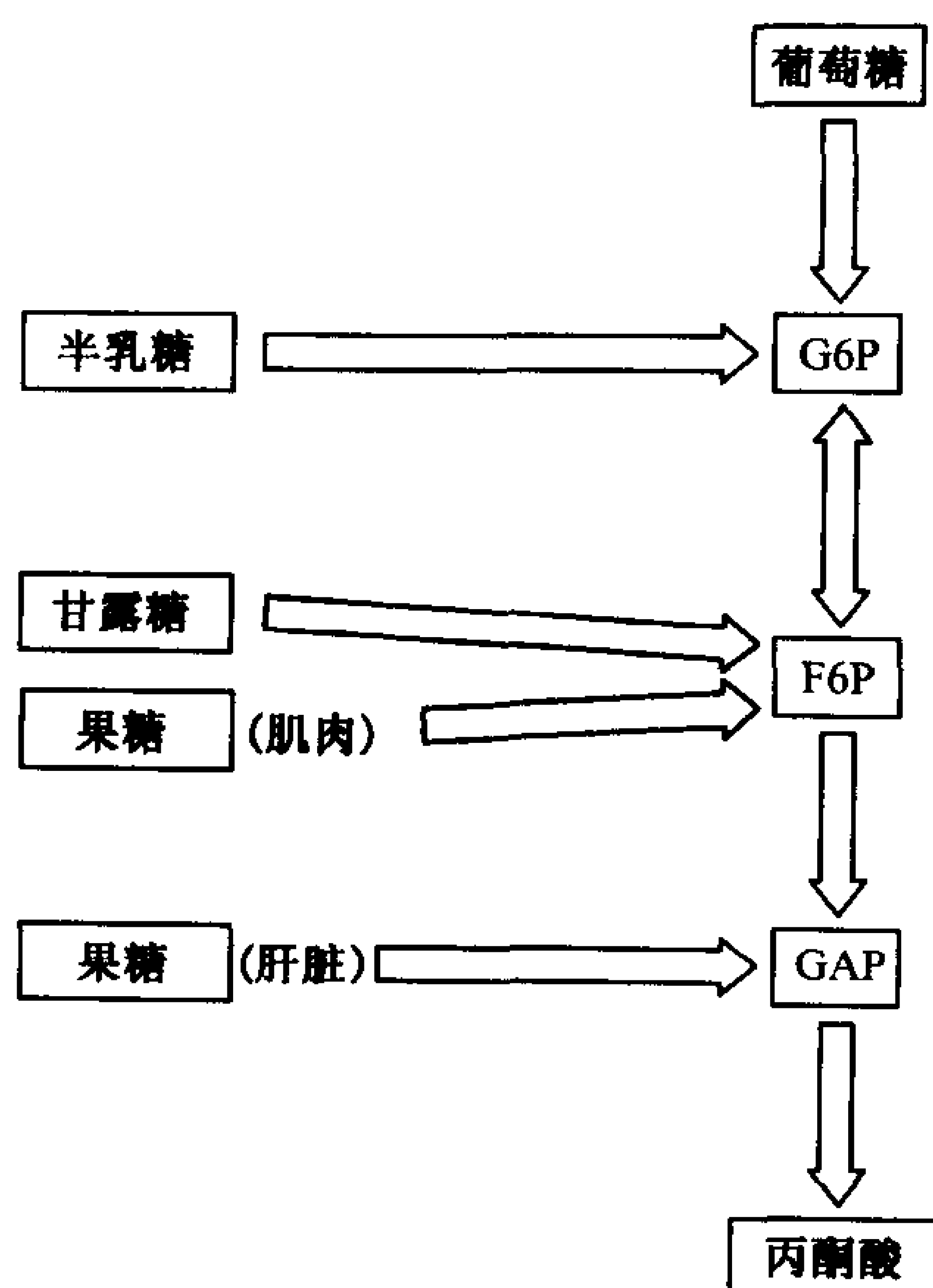


图 14-25　其他己糖进入糖酵解途经
果糖(肌肉中)和甘露糖转变为 F6P;肝脏中果糖转变为 GAP;半乳糖则转变为 G6P。

果糖在肌肉中的代谢和葡萄糖略有差别,己糖激酶(节 14-2A)将葡萄糖转变为 G6P,并使果糖磷酸化生成 F6P(图 14-26 的左边),所以果糖进入糖酵解只涉及一步反应。

肝脏中含有一种己糖激酶,被称为**葡萄糖激酶**(glucokinase),它与己糖(包括果糖)的亲和力很低(节 21-1D),因此果糖在肝脏中的代谢必然不同于肌肉。事实上,肝脏转变果糖成为糖酵解的中间物要通过一个涉及 7 种酶参加的途径(图 14-26 的右边):

1) **果糖激酶**(fructokinase)催化果糖的 C1 被 ATP 磷酸化的反应,生成**果糖-1-磷酸**(fructose-1-phosphate),己糖激酶或 PFK 都不能使果糖-1-磷酸的第 6 位碳原子磷酸化形成糖酵解中间物 FBP。
2) 第 I 类醛缩酶(节 14-2D)具有好几种同功酶形式。肌肉中有 A 型醛缩酶,它专一地作用于 FBP。但肝脏中具有 B 型醛缩酶,果糖-1-磷酸也是它的底物[B 型醛缩酶有时又称为**果糖-1-磷酸醛缩酶**(fructose-1-phosphate aldolase)]。在肝脏中果糖-1-磷酸因此可进行醇醛裂解:



果糖-1-磷酸⇌磷酸二羟丙酮 + 甘油醛

3) **甘油醛**(glyceraldehyde)可以通过**甘油醛激酶**(glyceraldehyde kinase)直接被 ATP 磷酸化形成糖酵解的中间物 GAP。　413
4) 另一种可能,甘油醛被转变为糖酵解中间物 DHAP。先被乙醇脱氢酶(反应 4)所催化的需 NADH 的还原反应转变为甘油,再通过**甘油激酶**(glycerol kinose)(反应 5)的活性磷酸化形成 **3-磷酸甘油**,后被**甘油磷酸脱氢酶**(glycerol phosphate dehydrogenase)(反应 6)所催化生成 DHAP。DHAP 再通过磷酸三糖异构酶(反应 7)转变为 GAP。

这两条导致甘油醛生成 GAP 的途径具有相同的净值:都消耗 ATP,虽然在反应 4 中 NADH 被氧化,但在反应 6 中又重新被还原。较长的这条途径产生甘油-3-磷酸(伴随着 DHAP),可以变成甘油磷脂和三脂酰甘油的甘油骨架(节 19-6A)。

过多的果糖消耗肝脏的 P_i

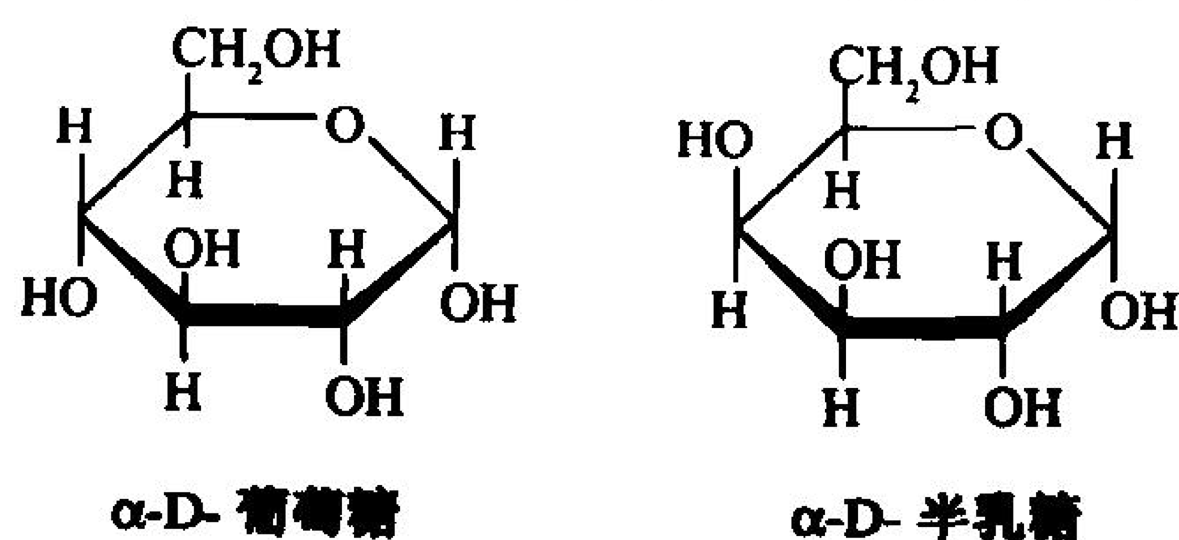
曾经认为静脉滴注果糖要比葡萄糖更有利。然而当血液中这种糖浓度太高时(比食用含果糖的食物可以达到的浓度更高),肝脏就遇到了代谢问题。当果糖的浓度很高时,果糖-1-磷酸的产生快于 B 型醛缩酶断裂它的速度,因此静脉注入大量果糖,结果使果糖-1-磷酸堆积得很多,严　414

图 14-26 果糖的代谢

在肌肉中(左边)果糖转变为糖酵解中间物 F6P,只涉及一种酶,己糖激酶。在肝脏中(右边)有 7 种酶参加了从果糖到糖酵解中间物的转变,它们是(1)果糖激酶。(2)果糖-1-磷酸醛缩酶。(3)甘油醛激酶。(4)乙醇脱氢酶。(5)甘油酶。(6)甘油磷酸脱氢酶和(7)丙糖磷酸异构酶。

重地消耗了肝脏中 P_i 的储备,在这种情况下,[ATP]下降,从而活化了糖酵解和乳酸的产生。在这种情况下,血液中乳酸的浓度能达到威胁生命的水平。

果糖不耐受性(fructose intolerance)是一种遗传病,这种病吃果糖也会造成像静脉注射果糖一样的果糖-1-磷酸堆积。因为缺乏 B 型醛缩酶,这种情况常表现为自我限制,即果糖不耐受的人很快发展成强烈的对任何甜食的厌恶感。



B. 半乳糖

半乳糖是从乳制品的乳糖(一种半乳糖和葡萄糖的双糖;节 8-2A)水解而得,半乳糖和葡萄糖(左边)是立体异构

体,它们仅仅在 C4 位的构型上有所区别。虽然己糖激酶可以使葡萄糖、果糖和甘露糖磷酸化,但它不能识别半乳糖。因此,在半乳糖进入糖酵解途径之前必然要发生立体异构化反应。这种反应发生在半乳糖转变为它的**尿苷二磷酸**(uridine diphosphate)衍生物之后(UDP-糖和其他的核苷酸-糖的作用在节 15-5 中将详细讨论)。半乳糖转变为糖酵解中间物的整个途径需要 4 步反应(图 14-27):

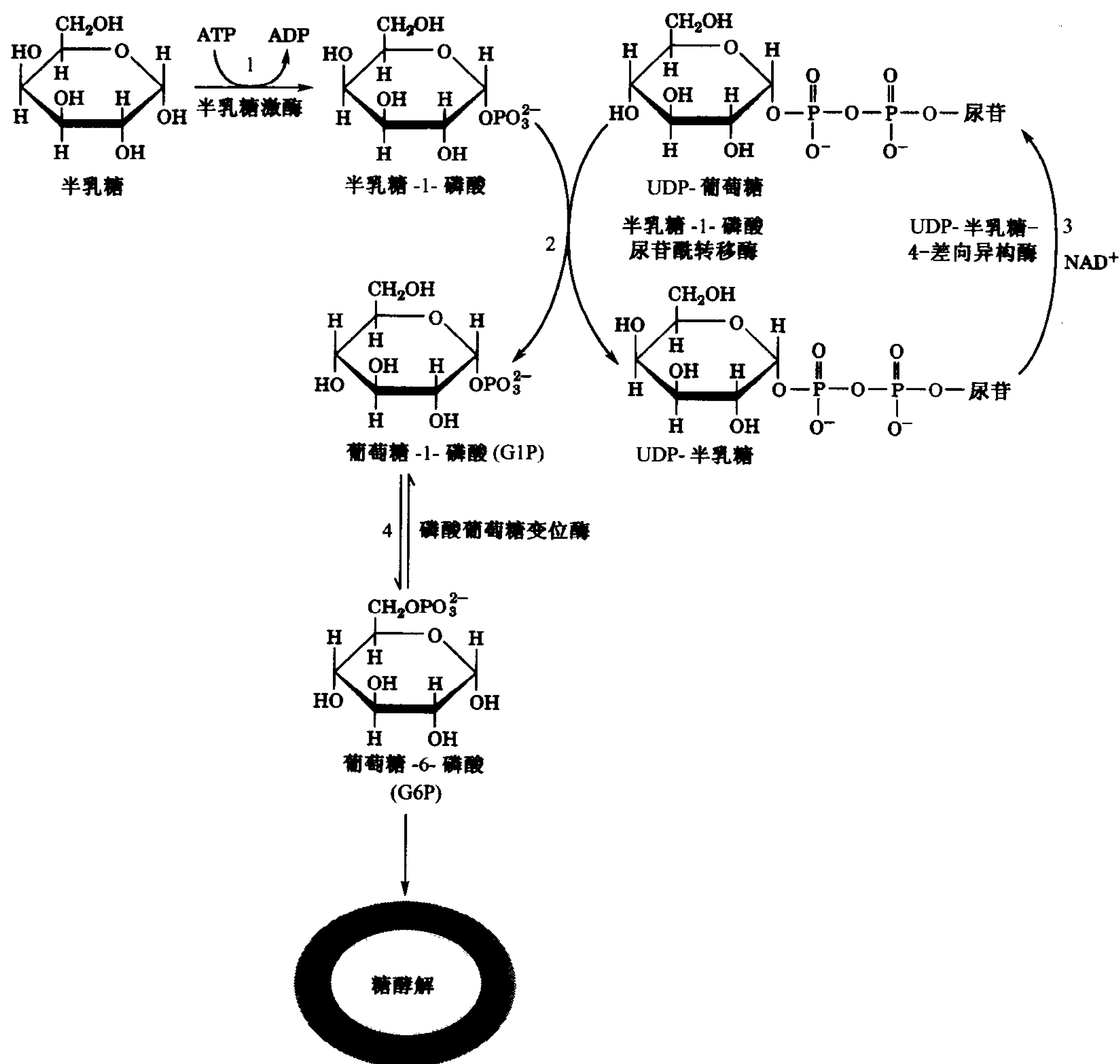


图 14-27　半乳糖的代谢

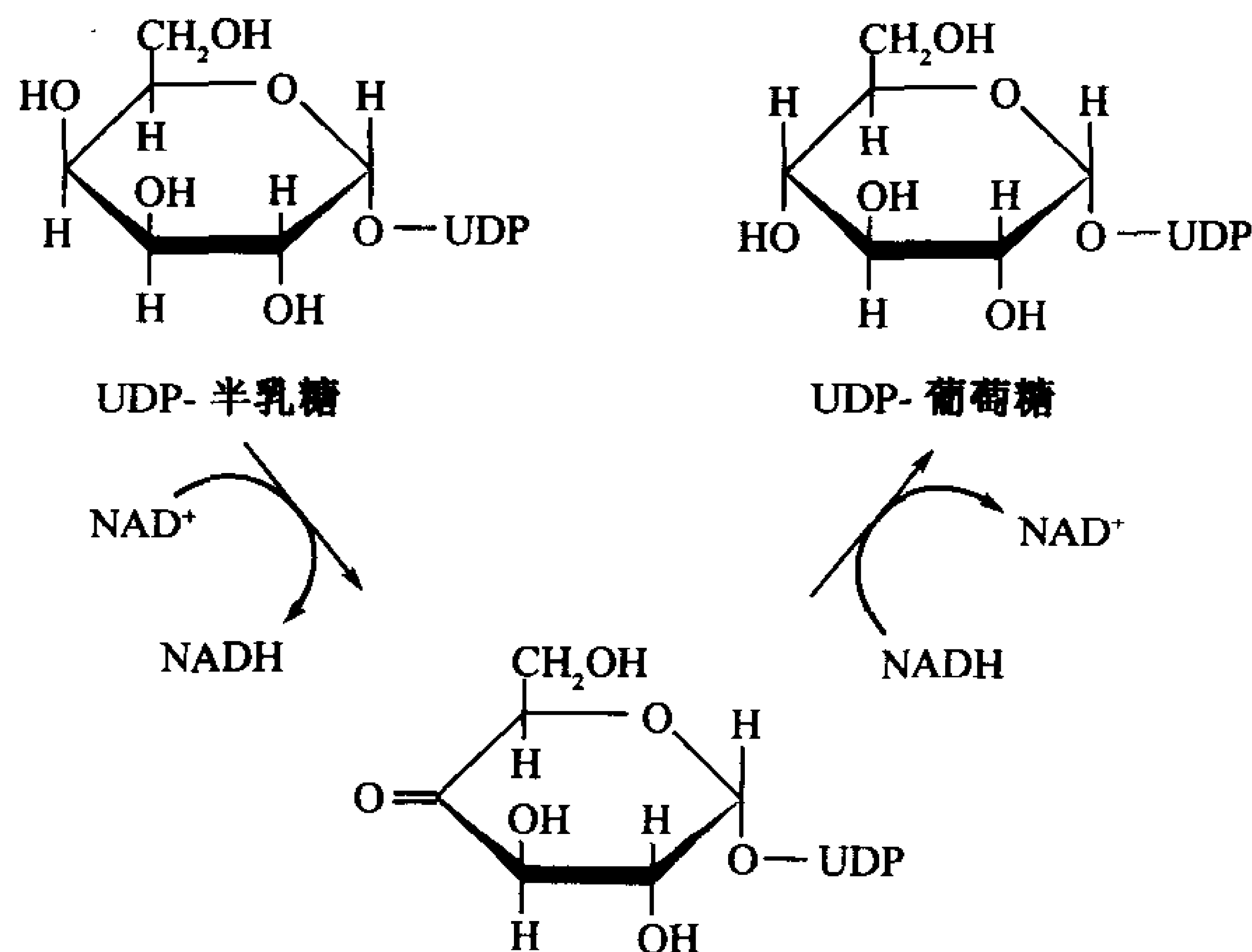
半乳糖转变为糖酵解中间物 G6P 有 4 种酶参与(1)半乳糖激酶。(2)半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶。(3)UDP-半乳糖-4-差向异构酶和(4)磷酸葡萄糖变位酶。

1) 半乳糖在**半乳糖激酶**(galactokinase)催化的反应中其 C1 位被 ATP 磷酸化。

2) **半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶**,将 UDP-葡萄糖上的尿苷酸转移到**半乳糖-1-磷酸**上,通过可逆地断裂 UDP-葡萄糖的焦磷酸键产生**葡萄糖-1-磷酸**(G1P)和 **UDP-半乳糖**。

3) **UDP-半乳糖-4-立体异构酶**将 UDP-半乳糖回转为 UDP-葡萄糖。此酶有一个结合的

NAD^+，说明反应涉及己糖 C4 原子的顺序性氧化和还原。

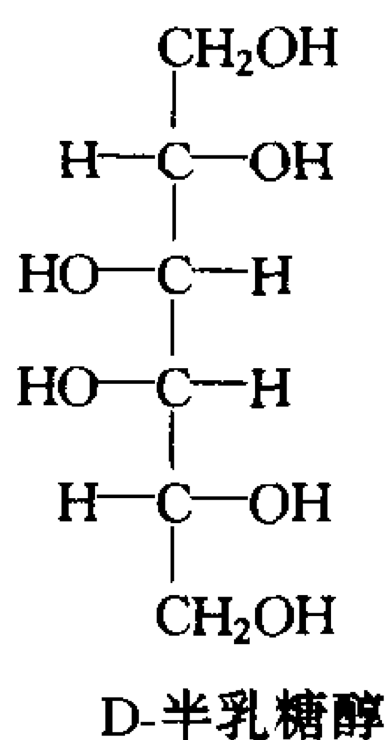


415　　4）通过**磷酸葡萄糖变位酶**，G1P 转变为糖酵解中间物 G6P。

半乳糖血症

半乳糖血症(galactose mia)是一种遗传性疾病，它的特征是不能将半乳糖转变为葡萄糖，它的症状包括生长停滞，智力迟钝，在某些病例中死于肝损伤。大多数半乳糖血症涉及催化反应 2 的半乳糖-1-磷酸尿苷酰转移酶的缺陷。结果从半乳糖-1-磷酸生成 UDP-半乳糖的过程受阻，导

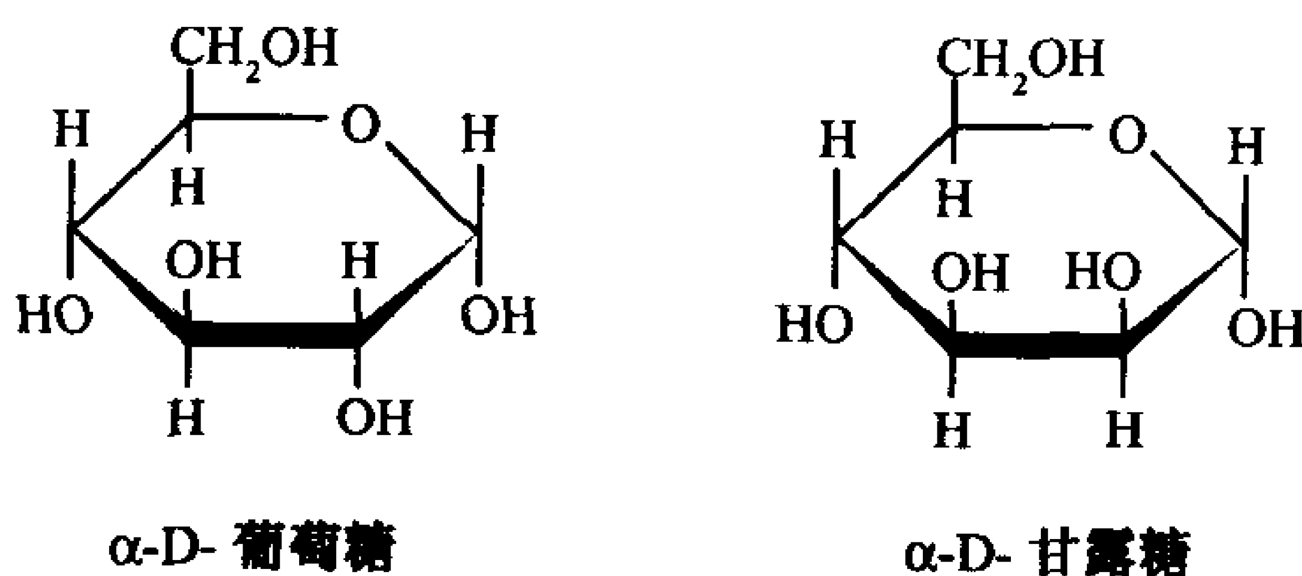
416　致有毒副产物的积累。例如，血液中半乳糖浓度的增加导致眼睛晶状体中有较高的半乳糖浓度，并在眼睛中还原为半乳糖醇，眼睛中这种糖醇的存在最终在晶状体中导致白内障的形成(晶状体模糊)。


D-半乳糖醇

半乳糖血症可以通过无乳糖膳食进行治疗，除了智力迟钝外，该病的所有症状都可因此逆转。半乳糖苷单位是糖蛋白(节 8-3)和糖脂(节 9-1D)合成所必不可少的，可以通过差向异构酶的逆反应从葡萄糖合成，所以并不一定要从膳食中得到半乳糖。

C. 甘露糖

甘露糖是多糖和糖蛋白的消化产物，它是葡萄糖 C2 位的立体异构物：


α-D-葡萄糖　　α-D-甘露糖

甘露糖可以通过一个二步反应的途径转变为 F6P 而进入糖酵解途径(图 14-28):

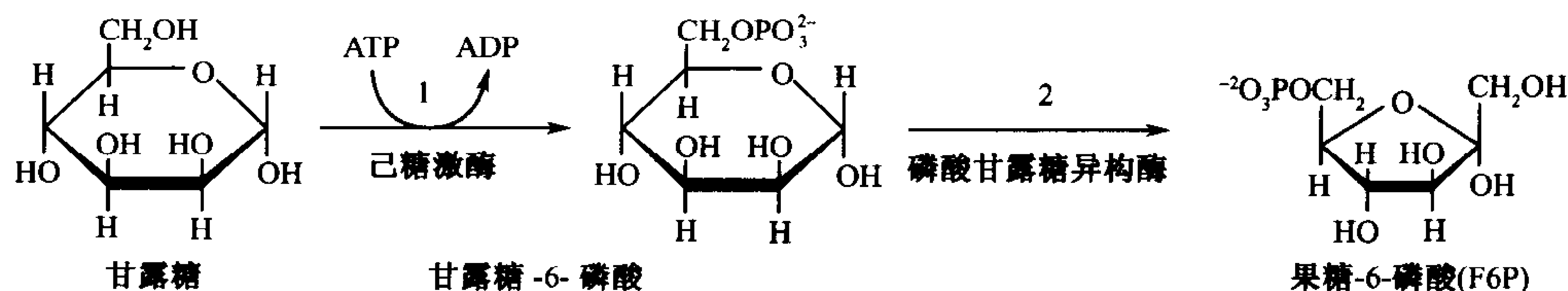


图 14-28 甘露糖的代谢

甘露糖转变为糖酵解中间物 F6P 需要二个酶参加:(1)己糖激酶和(2)磷酸甘露糖异构酶。

1) 己糖激酶识别甘露糖,并使之转变为**甘露糖-6-磷酸**。

2) **磷酸甘露糖异构酶**将此醛糖转变为糖酵解中间物 F6P,此反应的机制和磷酸葡萄糖异构酶很相似(节 14-2B)。

6. 磷酸戊糖途径

ATP 是细胞的"能量货币",它的放能裂解和许多其他吸能的细胞功能相偶联。细胞还具有第二种货币,这就是还原能力。许多吸能反应,特别是脂肪酸(节 19-4)和胆固醇(节 19-7A)的还原性生物合成,它们除了需要 ATP 外,还需要 NADPH。尽管 NADPH 和 NADH 在化学上十分相似,但它们在代谢上却不能互换,NADH 利用代谢物氧化产生的自由能合成 ATP(氧化磷酸化),NADPH 则利用代谢物的氧化自由能进行还原性生物合成。这种差别可能是因为涉及氧化和还原代谢中的脱氢酶对它们各自的辅酶是高度专一的。事实上,细胞在正常情况下,[NAD^+]/[NADH]的比例保持在接近 1000,所以倾向于代谢物的氧化;而[$NADP^+$]/[NADPH]的比例则常保持在 0.01,这样有利于还原性生物合成。 417

NADPH 是葡萄糖-6-磷酸通过一条糖酵解的支路——磷酸戊糖途径(也称为**己糖单磷酸支路**,图 14-29)氧化而产生的。凡涉及很强的脂质合成的组织(如肝脏、乳腺、脂肪组织和肾上腺皮质),都富含磷酸戊糖途径中的酶,事实上,肝脏中有 30% 的葡萄糖氧化是通过磷酸戊糖途径,而不是通过糖酵解。

磷酸戊糖途径的总反应是



$$3G6P + 6NADP^+ + 3H_2O \rightleftharpoons 6NADPH + 6H^+ + 3CO_2 + 2F6P + GAP$$

然而,此途径也可以认为是分 3 阶段进行的:

第 1 阶段 氧化反应(图 14-29,反应 1～3)产生 NADPH 和**核酮糖-5-磷酸**(Ru5P)。



$$3G6P + 6NADP^+ + 3H_2O \longrightarrow 6NADPH + 6H^+ + 3CO_2 + 3Ru5P$$

第 2 阶段 异构化和差向异构化反应(图 14-29,反应 4～5)将 Ru5P 或者转变为**核糖-5-磷酸**(R5P),或者转变为**木酮糖-5-磷酸**(Xu5P)。



$$3Ru5P \rightleftharpoons R5P + 2Xu5P$$

第 3 阶段 是一系列 C—C 键断裂和形成的反应(图 14-29,反应 6～8),2 分子 Xu5P 和一分子 R5P 转变为 2 分子 F6P 和 1 分子 GAP。

阶段 2 和 3 的反应是自由可逆的,所以途径的产物随细胞的需要而变化。在这一节中我们讨论

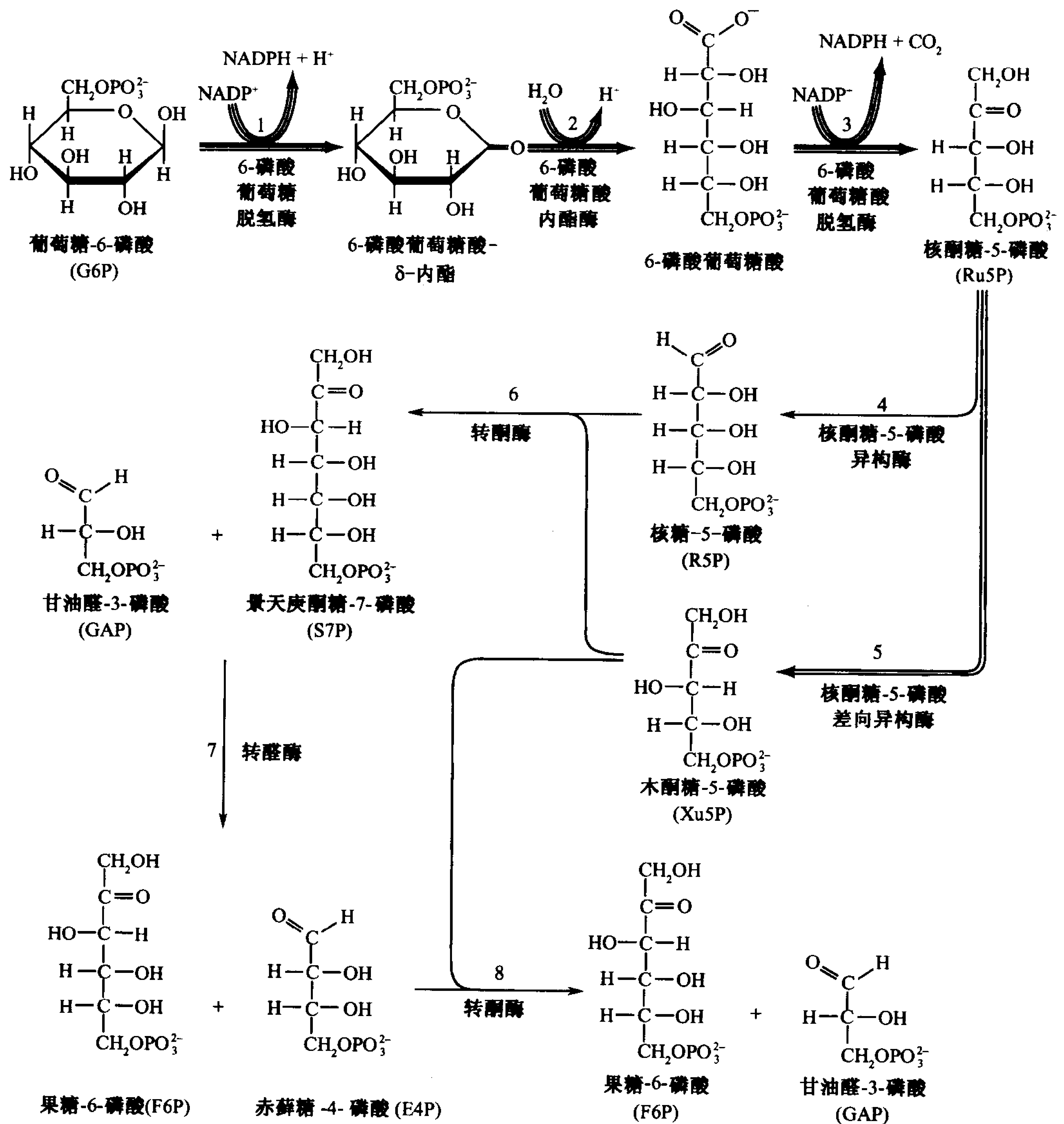


图 14-29 代谢的秘诀:磷酸戊糖途径

图中每个箭头中的线条数代表在这轮途径中参与反应的分子数。所以3个G6P转变生成3个CO_2、2个F6P和1个GAP。为清楚起见,从反应3开始的糖均用其线性分子式表示,R5P的碳骨架和由它衍生而来的碳原子都用红色表示,而从Xu5P衍生来的碳原子则用绿色表示,被转酮基酶转移的C2单位用绿色覆盖,被转醛酶转移的C3单位则用蓝色覆盖。

磷酸戊糖途径的3个阶段,以及该途径是如何被控制的。

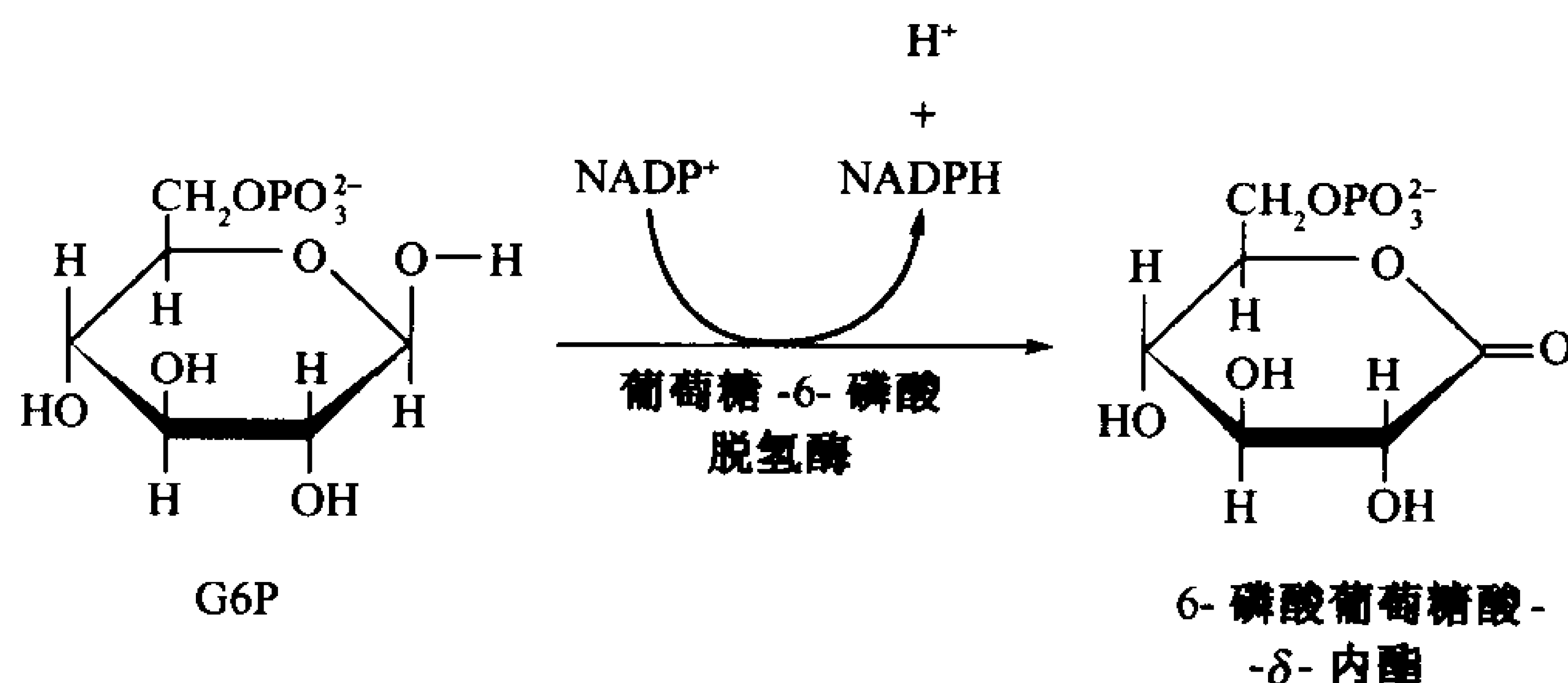
A. 阶段1:产生NADPH的氧化反应

G6P被认为是磷酸戊糖途径的起始点。该代谢物也可以通过己糖激酶作用于葡萄糖产生(糖酵解途径反应1;节14-2A)或从糖原降解产生(它可以直接产生G6P;节15-1),只有磷酸戊糖

途径中起始的三步反应涉及 NADPH 的产生(图 14-29)：

1) **葡萄糖-6-磷酸脱氢酶**(G6PD)催化从 G6P 的 C1 上将一个氢阴离子净转移到 $NADP^+$ 上生成 **6-磷酸葡萄糖酸-δ-内酯。** 418

G6P 是一个环状的半缩醛，其 C1 位醛处于氧化状态，因而氧化成环酯(内酯)，此酶对 $NADP^+$ 是专一的，并可被 NADPH 强烈抑制。



2) **6-磷酸葡萄糖酸内酯酶**增加 6-磷酸葡萄糖酸-δ-内酯水解为 **6-磷酸葡萄糖酸**的速度(非酶反应也具有一定的速度)。 419

3) **6-磷酸葡萄糖酸脱氢酶**催化 6-磷酸葡萄糖酸——一个 β-羟酸的氧化脱羧，成为 Ru5P 和 CO_2(图 14-30)。这一反应被认为是通过形成 β-酮酸中间物而进行的，此酮基可能作为电子接受者而有利于脱羧。

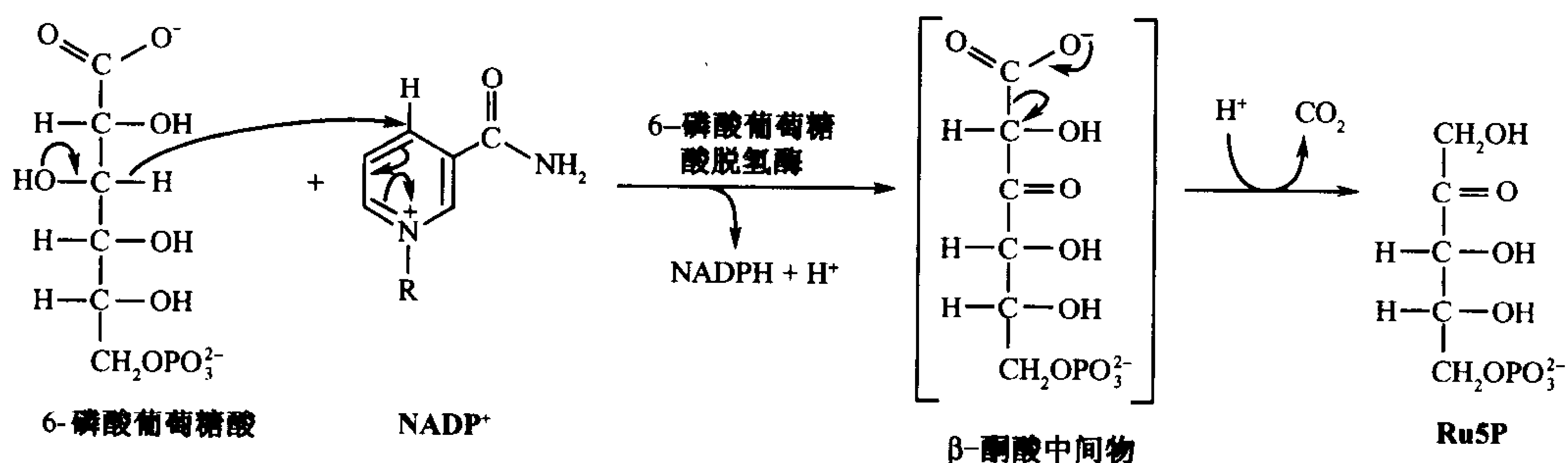


图 14-30　6-磷酸葡萄糖酸脱氧酶反应

OH 基的氧化形成一个很容易脱羧基的 β-酮酸(虽然假定的中间物尚未被分离出来)

Ru5P 的生成，完成了磷酸戊糖途径的氧化部分，进入该途径的每分子 G6P 产生两分子的 NADPH。

B. 阶段 2：核酮糖-5-磷酸的异构化和差向异构化作用

Ru5P 通过**核酮糖-5-磷酸异构酶**(图 14-29，反应 4)转变为 R5P，或者通过**核酮糖-5-磷酸差向异构酶**(图 14-29 中的反应 5)转变为 Xu5P，这些异构化和差向异构化反应就像磷酸丙糖异构酶(节 14-2E)所催化的反应一样，被认为是通过烯二醇酸中间物进行的。

从 Ru5P 产生 R5P 和 Xu5P 的相对量是由细胞的需要决定的。例如 R5P 是核苷酸生物合成的必需前体(第 22 章)，因此，在快速分裂的细胞中，R5P 的生成相对较高(事实上，整个磷酸戊糖途径的活性都提高了)，DNA 的合成亦增加。如果途径仅仅是用来产生 NADPH，Xu5P 和 R5P

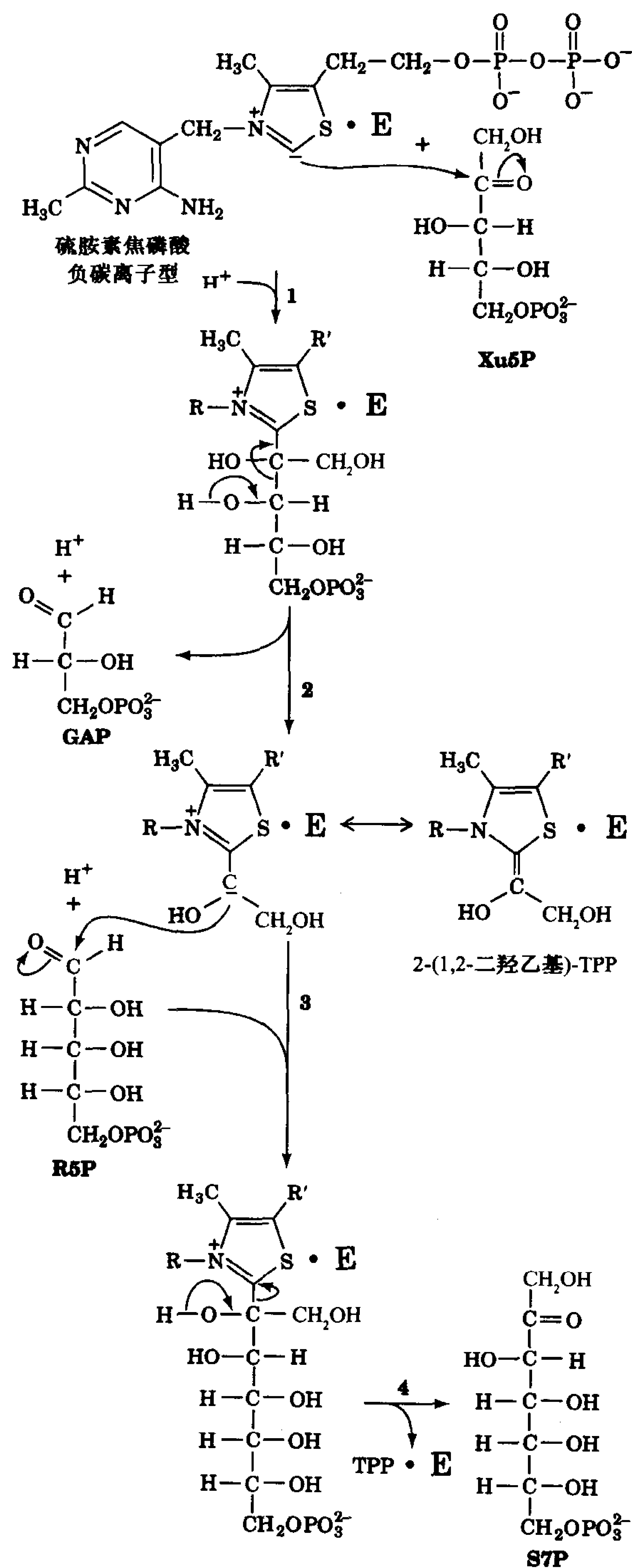


图 14-31 转酮酶的作用机制

转酮酶(以 E 表示)用辅酶 TPP 来稳定由 Xu5P 的 C2—C3 键断裂生成的负碳离子。反应按下列顺序发生:(1)TPP 偶极负碳离子(ylid)攻击 Xu5P 的羰基。(2)C2—C3 键断裂产生 GAP 和酶结合的 2-(1,2-二羟乙基)-TPP,一个共振稳定的负碳离子。(3)C2 负碳离子攻击 R5P 的醛基碳形成 S7P-TPP 加成物。(4)TPP 被去除,产生 S7P 和重新生成的 TPP-酶。

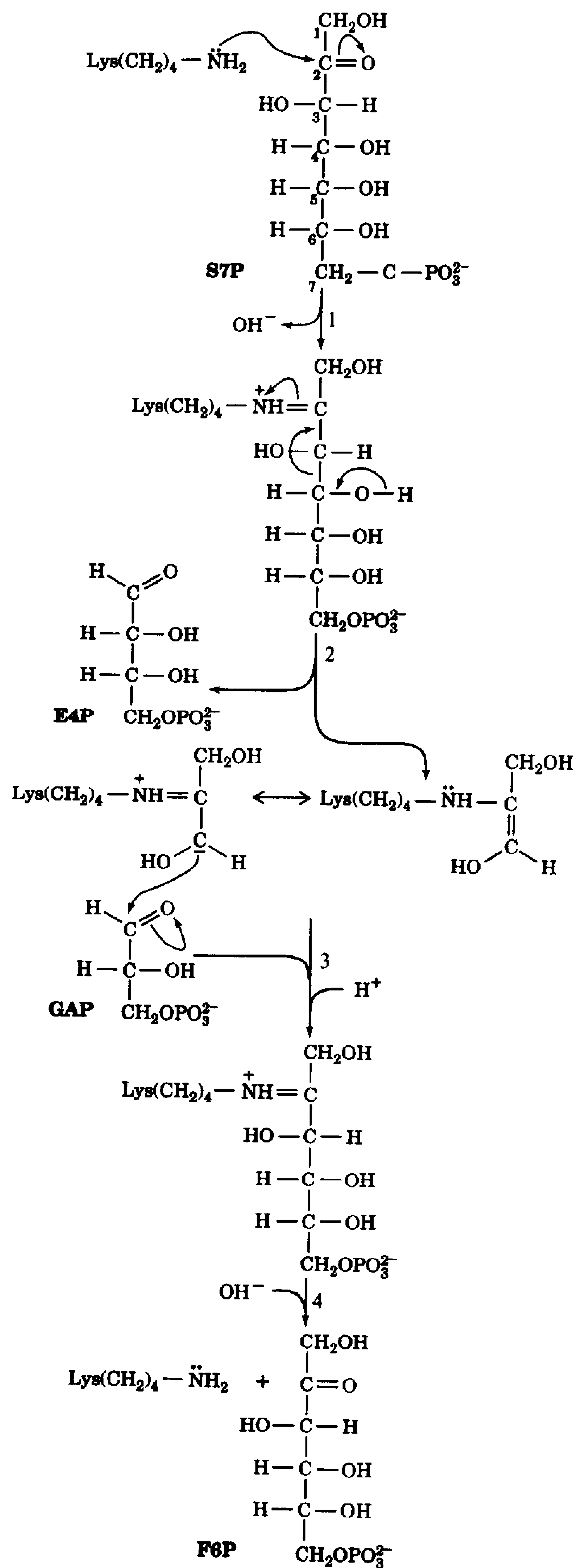


图 14-32　转醛酶的作用机制

转醛酶含有一个必需的 Lys 残基，有利于醛醇的断裂反应：(1)Lys 的 ε-氨基与 S7P 的羰基形成希夫碱。(2)被希夫碱所稳定的 C3 负碳离子在 C3 和 C4 的醛醇断裂中形成，并除去 E4P。(3)酶结合的共振稳定的负碳离子加合到 GAP 的羰基碳原子上，形成的 F6P 通过希夫碱与酶连结。(4)希夫碱水解，活性酶再生，并释放出 F6P。

421 按 2∶1 比例产生，用以在磷酸戊糖途径的第 3 阶段转变为糖酵解中间物，这将在下面讨论。

C．阶段 3：碳-碳键的断裂和形成反应

一个五碳糖是如何转换为六碳糖如 F6P 的呢？在磷酸戊糖途径的第 3 阶段中，碳原子的重排依照途径的化学计量学考虑是较易理解的。在第一阶段中每 3 分子 G6P 进入途径产生 3 分子 Ru5P，这 3 个戊糖然后转变为 1 个 R5P 和 2 个 Xu5P(图 14-29，反应 4 和 5)，这 3 个 C_5 糖再转变为 2 个 C_6 糖和 1 个 C_3 糖，这种从 3 个 C_5 糖转变为 2 个 C_6 糖和一个 C_3 糖的反应涉及二种酶，即**转醛酶**(transaldolase)和**转酮酶**(transketolase)所催化的一个非凡的"变换作用"，这些酶的作用机制涉及稳定化的负碳离子的生成以及将它们加合到醛基的亲电子中心上。

转酮酶催化 C_2 单位的转移

转酮酶，它具有一个焦磷酸硫胺素辅因子(TPP；节 14-3B)，可以从 Xu5P 上将一个 C_2 单位转到 R5P 上，产生 GAP 和**景天庚酮糖-7-磷酸**(S7P，图 14-29，反应 6)。反应中间物是 Xu5P 和 TPP(图 14-31)的一个共价加成物。二聚体酶的 X 射线结构显示，TPP 结合在两亚基之间的一个深隙中，所以二个亚基上的残基都参与和它结合，正如丙酮酸脱羧酶一样[这是另一个需 TPP 的酶(图 14-19)]。事实上，它们的结构是如此相似，看来它们是从一个共同的祖先分化出来的。

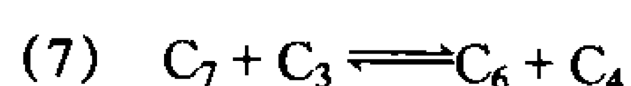
转醛酶催化 C_3 单位的转移

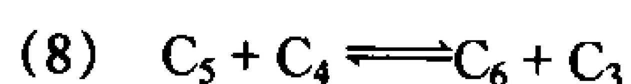
转醛酶催化 S7P 上 C_3 单位转移到 GAP 上产生**赤藓糖-4-磷酸**(E4P)和 F6P(图 14-29，反应 7)。反应从一个必需的 Lys 残基的 ε-氨基和 S7P(图 14-32)的羰基之间形成 Schiff 碱开始，通过醛醇裂解(节 14-2D)进行。

第二次转酮酶反应产生甘油醛-3-磷酸和第二个果糖-6-磷酸分子

在第二次转酮酶反应中，一个 C_2 单位从第二个 Xu5P 分子上转到 E4P 上产生 GAP 和另一分子 F6P(图 14-29，反应 8)。磷酸戊糖途径的第 3 阶段从而将 2 分子的 Xu5P 和 1 分子的 R5P 转换成 2 分子 F6P 和 1 分子 GAP。这些碳骨架的转换(图 14-29，反应 6-8)总结在图 14-33 中。

(6)  $C_5 + C_5 \rightleftharpoons C_7 + C_3$

(7)  $C_7 + C_3 \rightleftharpoons C_6 + C_4$

(8)  $C_5 + C_4 \rightleftharpoons C_6 + C_3$

(总计)  $3C_5 \rightleftharpoons 2C_6 + C_3$

图 14-33 戊糖磷酸途径中碳骨架重排的总结

从 3 个 C_5 糖经过一系列碳-碳键的形成和断裂，转变为 2 个 C_6 糖和 1 个 C_3 糖，每步反应左边的数目是图 14-29 中的相应步骤。

422

D．磷酸戊糖途径的调控

磷酸戊糖途径的主要产物是 R5P 和 NADPH。当代谢对 NADPH 的需要超过了核苷酸生物合成对 R5P 的需要时，转酮酶和转醛酶反应可使过量的 R5P 转变为糖酵解的中间物，生成的 F6P 和 GAP 可以通过糖酵解和氧化磷酸化，或通过糖异生作用的再循环生成 G6P(节 15-4)而消耗掉。

当对 R5P 的需要超过了对 NADPH 的需要时，F6P 和 GAP 可从糖酵解途径中分流出来，通过转醛酶和转酮酶的逆反应合成 R5P。糖酵解和磷酸戊糖途径之间的关系图示于图 14-34 中。

通过磷酸戊糖途径的流量以及 NADPH 产生的速度是受葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的反应速度

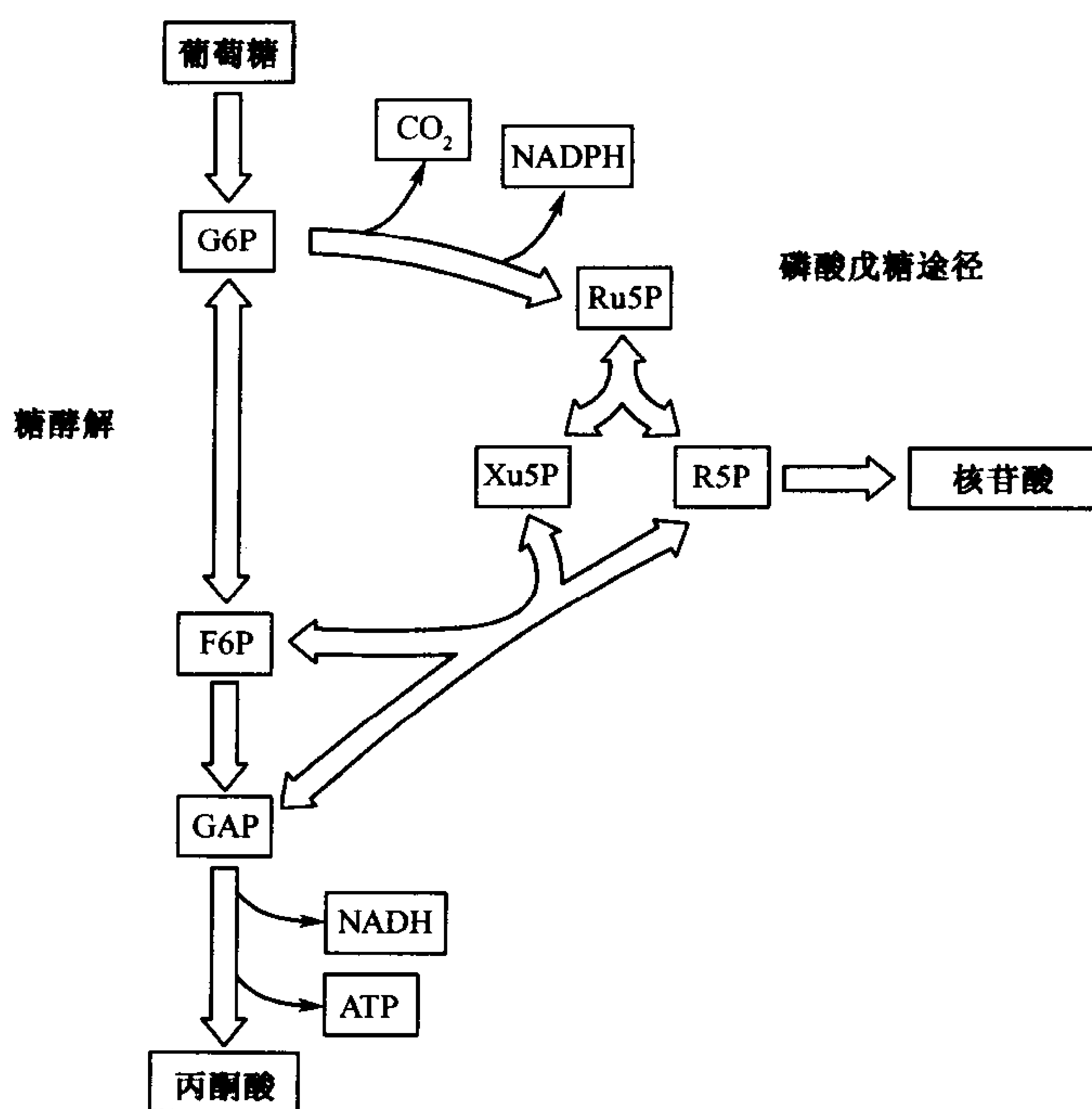


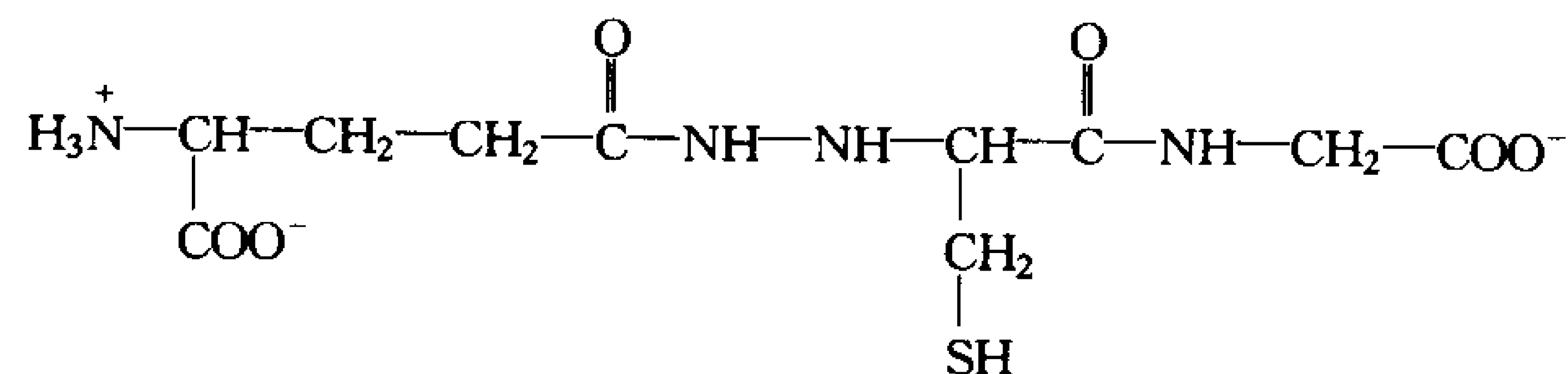
图 14-34　糖酵解和磷酸戊糖途径的关系
磷酸戊糖途径以糖酵解的第二步产生的 G6P 为起点，产生 NADPH 用于还原反应，产生的 R5P 用于核苷酸的合成。过量的 R5P 通过一系列反应转变为糖酵解中间物，如果需要，这一系列反应可逆转产生更多的 R5P。

(图 14-29，反应 1）控制的。该酶的活性，亦即该酶催化戊糖途径的第一个受制性步骤($\Delta G = -17.6 kJ \cdot mol^{-1}$，在肝中)，是受 $NADP^+$ 浓度调控的(受底物可用性的调节)。当细胞消耗了 NADPH，$NADP^+$ 的浓度上升，增加了 G6PD 反应的速度，从而刺激 NADPH 的再生。在某些组织中，酶量的合成也是在激素控制之下的。G6PD 缺陷是最常见的具有临床意义的磷酸戊糖途径的酶缺陷病(见框 14-3)。

框 14-3　健康和疾病的生物化学

葡萄糖-6-磷酸脱氢酶缺陷

NADPH 是除生物合成外许多还原过程所必需的，例如红细胞需要大量提供还原谷胱甘肽(GSH)——一个含半胱氨酸的三肽。



谷胱甘肽(GSH)
(γ-L-谷氨酰-L-半胱氨酰甘氨酸)

在红细胞中，GSH 的主要功能是还原性地清除 H_2O_2 和有机过氧化物，它们是活性氧代谢物，会不可逆地伤害血红蛋白，并使细胞膜磷脂的尾部的 C—C 键断裂。过氧化物不受抑制地堆积会导致未成熟细胞的自溶。过氧化物可与谷胱甘肽反应而被清除。反应是由谷胱甘肽过氧化酶所催化。



$$2GSH + R—O—O—H \xrightarrow{\text{谷胱甘肽过氧化酶}} GSSG + ROH + H_2O$$

有机过氧化物

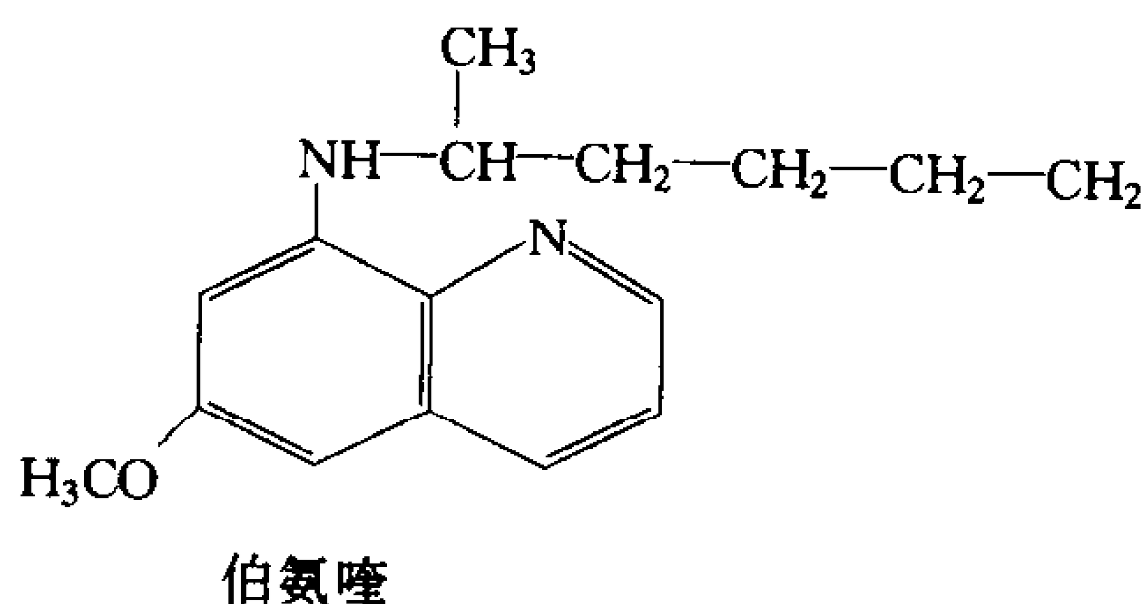
GSSG 代表氧化型谷胱甘肽(二个 GSH 分子通过巯基形成二硫键连接),GSSG 随后通过 NADPH 还原,使还原态 GSH 得以再生,这反应是由谷胱甘肽还原酶所催化。



$$GSSG + NADPH + H^+ \xrightarrow{\text{谷胱甘肽还原酶}} 2GSH + NADP^+$$

稳定地提供 NADPH 对维持红细胞的完整性是极为重要的。

有些人的红细胞缺少葡萄糖-6-磷酸脱氧酶(G6PD),对氧化性损伤特别敏感,虽然可能并不出现临床症状。这种酶缺陷的人在非洲、亚洲和地中海人群中是很常见的,这是通过对溶血性贫血的研究发现的,这些人在服用药物例如抗疟化合物伯氨喹时,或者吃了蚕豆(broad beans, *Vicia faba*),一种在中东普通食用的疏菜,会诱发溶血性贫血。伯氨喹刺激过氧化物的生成,因而增加了对 NADPH 的需求,使这种突变的细胞达不到这一水平。蚕豆中存在很小量的有毒糖苷,也具有同样的作用,是引发被称为蚕豆病的原因。



伯氨喹

在受影响的细胞中,造成低酶活性的主要原因是突变酶的分解速度加快。这就解释了为什么患有相对中等程度的 G6PD 缺陷的病人对伯氨喹药溶血性贫血反应,在一星期内可以恢复,尽管伯氨喹的治疗仍旧继续。成熟的红细胞缺少细胞核和蛋白质合成机制,因此不能合成新的酶分子替代被降解的分子(它们同样也不能合成新的膜成分,这就是为什么首先它们对膜的损伤是如此敏感)。伯氨喹开始治疗导致老的血红细胞的溶解,它们的缺陷性 G6PD 大量降解,溶解产物刺激了年轻细胞的释出,这些细胞含有较多的酶,因此能比较好地应付伯氨喹的压力。

据估计大约有 4 亿人患有 G6PD 缺乏,成为人类最常见的酶缺陷病。世界的疟疾区也是 G6PD 缺陷症的高发区,这说明这种变异是对疟原虫(*Plasmodium falciparum*)寄生的一种抗性。实际上对疟原虫来说,带有 G6PD 缺陷的红细胞与正常红细胞相比是一个不太适合的宿主。和镰刀状细胞性状类似(框 7-3),对居住在疟疾流行区的人群来说,G6PD 的缺陷具有选择性优点。

奇怪的是,只有性联锁性状杂合子的女性对疟疾才有抵抗力。疟原虫最终适应生活在 G6PD 缺陷的红细胞中(男性只具有单个 X 染色体,因而缺陷基因也是单拷贝的,纯合子的女性每个细胞都会有 2 条 X 染色体)。显然,病原虫不适合寄生在杂合子女性中,因为她们体内大约一半的红细胞是有 G6PD 缺陷的,而其余一半是正常的。

研究剔除 G6PD 基因小鼠的发育阐明了 NADPH 在红细胞以外的细胞中的重要性。这些动物的所有细胞对氧化的压力十分敏感,尽管它们具有其他机制去清除活性氧。

小　结

1. 糖酵解是一个由 10 种酶依次催化的反应,通过这些反应,1 分子葡萄糖转变为 2 分子丙酮酸,净产生 2 个 ATP 并还原 2 个 NAD^+ 成为 2 个 NADH。
2. 在糖酵解的第一阶段,葡萄糖被己糖激酶磷酸化,被磷酸葡萄糖异构酶(PGI)异构化,被磷酸果糖激酶(PFK)磷酸化。醛缩酶将之断裂而得到丙糖甘油醛-3-磷酸(GAP)和磷酸二羟丙酮(DHAP),它们可以被丙糖磷酸异构酶(TIM)相互转化。通过这些反应,每个葡萄糖消耗 2 个 ATP。
3. 糖酵解的第二阶段,GAP 通过 3-磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)催化而氧化磷酸化。通过 3-磷酸甘油酸激酶(PGK)去磷酸化产生 ATP,再通过磷酸甘油酸变位酶(PGM)异构化,烯醇化酶脱水和丙酮酸激酶去磷酸化,

产生第二个 ATP 和丙酮酸。在此阶段一个葡萄糖产生 4 个 ATP，净得率为每个葡萄糖得到 2 个 ATP。

4. 在厌氧条件下，丙酮酸被还原并再生为 NAD^+ 供糖酵解用；在同型乳酸发酵中，丙酮酸被逆向还原为乳酸。
5. 在乙醇发酵中丙酮酸被焦磷酸硫胺素(TPP)依赖的机制脱羧，结果乙醛被还原为乙醇。
6. 由己糖激酶、磷酸果糖激酶和丙酮酸激酶所催化的糖酵解反应在代谢上是不可逆的。
7. 磷酸果糖激酶是糖酵解的原发流量控制点，ATP 对这个别构调节酶的抑制作用可以被 AMP 和 ADP 所解除，它们浓度的变化比 ATP 更显著。
8. 果糖-6-磷酸(F6P)/果糖-1,6-二磷酸(FBP)这二个相对的反应的底物循环，使糖酵解流量可有很大的改变。
9. 果糖、半乳糖和甘露糖可被酶转变为糖酵解中间物而进入分解代谢。
10. 在磷酸戊糖途径中，葡萄糖-6-磷酸(G6P)可以被氧化脱羧产生 2 个 NADPH、CO_2 和核酮糖-5-磷酸(Ru5P)。
11. 根据细胞的需要，核酮糖-5-磷酸可以被异构化为核糖-5-磷酸(R5P)供核苷酸的合成，也可以通过核糖-5-磷酸和木酮糖-5-磷酸(Xu5P)转变为果糖-6-磷酸和甘油醛-3-磷酸而重新进入糖酵解释途径。

参考文献

Beutler, E., G6PDH Deficiency, *Blood* **84**, 3613–3636 (1994).

Fell, D.A., Metabolic control analysis: a survey of its theoretical and experimental development, *Biochem. J.* **286**, 313–330 (1992).

Gefflaut, T., Blonski, C., Perie, J., and Wilson, M., Class I aldolases: substrate specificity, mechanism, inhibitors and structural aspects, *Prog. Biophys. Molec. Biol.* **63**, 301–340 (1995).

Goldsmith, E.J. and Cobb, M.H., Protein kinases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 833–840 (1994).

Knowles, J.R., Enzyme catalysis: not different, just better, *Nature* **350**, 121–124 (1991). [A lucid discussion of the triose phosphate isomerase mechanism.]

Luzzato, L. and Mehta, A., Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, *in* Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., and Fredrickson, D.S. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (7th ed.), pp. 3367–3398, McGraw–Hill (1995).

Mattevi, A., Valentini, G., Rizzi, M., Speranza, M.L., Bolognesi, M., and Coda, A., Crystal structure of *Escherichia coli* pyruvate kinase type I: molecular basis of allosteric transition, *Structure* **3**, 729–741 (1995).

Muirhead, H. and Watson, H., Glycolytic enzymes; from hexose to pyruvate, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 870–876 (1992). [A brief summary of the structures of glycolytic enzymes.]

Schirmer, T. and Evans, P.R., Structural basis of the allosteric behaviour of phosphofructokinase, *Nature* **343**, 140–145 (1990).

Wood, T., *The Pentose Phosphate Pathway,* Academic Press (1985).

关　键　词

糖酵解　glycolysis
乙醇发酵 a lcoholic fermentation
磷酸戊糖途径　pentose phosphate pathway
同型乳酸发酵　homolactic fermentation
醛基断裂　aldol cleavage
焦磷酸硫胺素　TPP
烯二醇中间物　enediol intermediate
巴斯德效应　Pasteur effect
催化作用的完美性　catalytic perfection
无效循环　futile cycle
变位酶　mutase

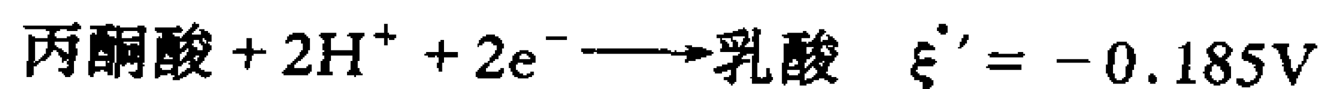
学习思考题

1. 写出糖酵解的各步反应及其中间物的结构式和催化各反应的酶的名称。
2. 描述丙酮酸 3 种可能的命运。
3. 描述调节磷酸果糖激酶活性的机制。
4. 什么是底物循环中的代谢优势？
5. 描述果糖、半乳糖和甘露糖是如何进入糖酵解途径的。
6. 简述磷酸戊糖途径的反应。

7. 对应 NADPH 或核糖-5-磷酸的需求，磷酸戊糖途径是如何改变流向的？

练 习 题

1. 醛缩酶反应可以作为醇醛缩合反应中的酶逆向进行。如果这酶不是立体特异性的，那么将会得到多少种不同的产物？
2. 砷酸(AsO_4^{3-})是磷酸的结构类似物，在所有以磷酸为底物的反应中，它都能作为底物参与。与磷酸酯不同，砷酸酯在动力学与热力学上都是不稳定的，而且立刻会被水解。写出从葡萄糖转变为丙酮酸，在有 ATP、ADP、NAD^+ 和(a)磷酸盐或(b)砷酸盐存在时的总平衡式。(c)为什么砷酸盐是一个毒药？
3. 画出核酮糖-5-磷酸异构酶的反应(Ru5P→R5P)和核酮糖-5-磷酸差向异构酶反应(Ru5P→Xu5P)中的烯二醇酸中间物。
4. (a)在表 14-1 中 ΔG 值和 $\Delta G^{\circ\prime}$ 值不同为什么是可能的？(b)如果一个反应的 $\Delta G^{\circ\prime}$ 值至少有 $-30.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$，那就足以驱动 ATP 的合成($\Delta G^{\circ\prime}=30.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)，当反应的 ΔG 只有 $-10\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时，是否仍能驱动体内 ATP 的合成呢？请解释。
5. 醛缩酶反应的 $\Delta G^{\circ\prime}$ 是 $22.8\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$，细胞在 37℃ 条件下，[DHAP]/[GAP] = 5.5。当[GAP] = $10^{-4}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，计算[FBP]/[GAP]的平衡比。
6. 乳酸脱氢酶反应的半反应和它们的标准还原势能是



$$\text{丙酮酸} + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow \text{乳酸} \quad \mathcal{E}^{\circ\prime} = -0.185\text{V}$$



$$NAD^+ + 2H^+ + 2e^- \longrightarrow NADH + H^+ \quad \mathcal{E}^{\circ\prime} = -0.315\text{V}$$

计算在 pH7.0 时，在下列各条件下的 ΔG 值。

(a)[乳酸]/[丙酮酸] = 1 和[NAD^+]/[NADH] = 1

(b)[乳酸]/[丙酮酸] = 160 和[NAD^+]/[NADH] = 160

(c)[乳酸]/[丙酮酸] = 1000 和[NAD^+]/[NADH] = 1000。

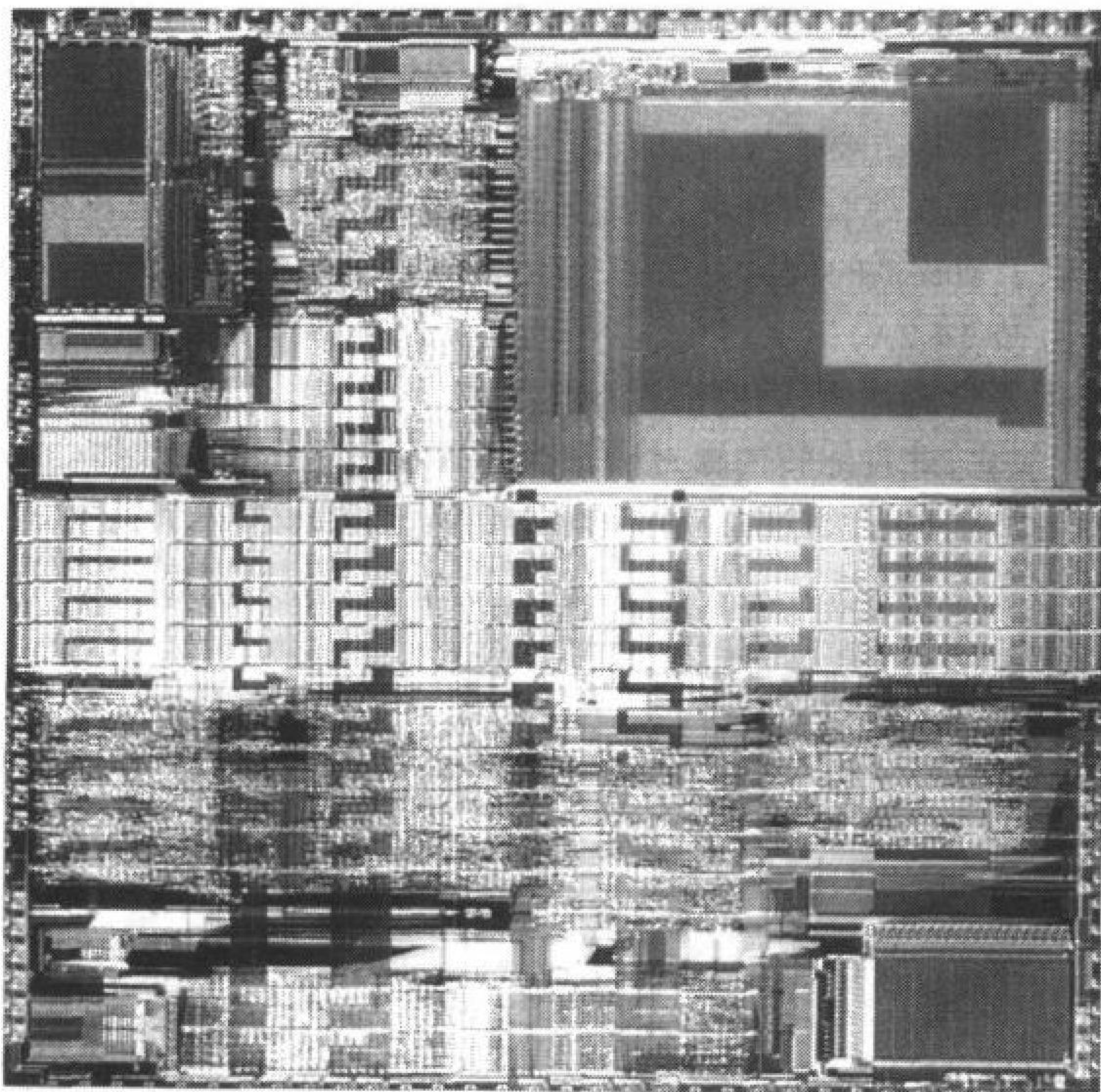
7. 由于 PFK 反应是糖酵解的原发调节点，试述它也可通过丙酮酸激酶反应调节流量的代谢重要性。
8. 3 个葡萄糖分子进入糖酵解并转变为丙酮酸；3 个葡萄糖分子通过磷酸戊糖途径，它们的碳骨架(即 2 个 F6P 和 1 个 GAP)重新进入糖酵解并代谢成为丙酮酸。比较这二种途径的 ATP 得率。
9. 如果在 G6P 的 C2 上加以标记，通过磷酸戊糖途径后，标记将出现在产物的哪些碳原子上？
10. 请解释为什么有些组织在高浓度的糖酵解抑制剂氟离子存在时仍能继续呼吸(产生 CO_2)。
11. 当 AMP、磷酸盐和果糖-2,6-二磷酸存在时，可以观察到肝脏和脑磷酸果糖激酶-1(PFK－1)的催化行为。下表列出了为达到最高速度 50%所需要的每种效应剂的浓度。比较这二种同工酶对 3 种效应剂的应答，并讨论它们不同应答的可能含义。

PFK-1 同工酶	磷酸盐	AMP	F2,6P
肝脏	$200\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$10\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$0.05\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
脑	$350\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$75\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	$4.5\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$

(问题由 Providence College 的 Kathleen Cornely 提供)

(南京大学 金以丰 译)

第 15 章　糖原代谢和糖异生作用



细胞能进行许多代谢过程，正如计算机芯片，在如此小的空间却高度组织化地进行着。像糖原代谢和糖异生作用这些代谢反应是如何调节到保证按照细胞的需要来净合成或降解特殊的分子呢？（引自 Thomas A. Way, I. B. M. 股份有限公司）

糖原（在动物、真菌以及细菌中）和淀粉（在植物中）的功能是作为葡萄糖的贮存物供以后的代谢之用。在动物中恒定地供应葡萄糖对组织至关重要。像脑和红细胞，它们几乎全靠葡萄糖

作为能源(其他组织也能氧化脂肪酸获得能量,节 19-2)。从糖原储备(主要在肝中)动员出葡萄糖给所有组织供应恒定的葡萄糖(血中约 5mmol·L^{-1})。当葡萄糖丰富时,例如饭后,糖原合成加速。然而肝脏贮存糖原的容量只够给脑提供大约半天的葡萄糖。在断食的条件下,身体所需的大部分葡萄糖是靠**糖异生作用**(gluconeogenesis)(字义为新葡萄糖合成)从非碳水化合物的前体如氨基酸来满足的。不必惊奇,葡萄糖合成、贮存、流通和被糖酵解(节 14-2)或磷酸戊糖途径(节 14-6)分解的调节对于生物即时或长期的能量需求而言是精巧和灵敏的。

糖原作为葡萄糖储备的重要性可由缺失释放贮存葡萄糖的酶的影响来清楚地说明。例如,**McArdle 病**是一种遗传病,其主要症状是肌肉用力时引起痛苦的痉挛。病人的肌肉缺乏分解糖原产生葡萄糖的酶,虽然正常地合成糖原,但它不能提供糖酵解的原料以维持对 ATP 的需要。

图 15-1 简要表示了葡萄糖的代谢用途,关键的分支点葡萄糖-6-磷酸(G6P)是游离的葡萄糖通过己糖激酶的作用(节 14-2A)衍生而来,也可以是糖原分解或糖异生作用的产物。G6P 有几种可能的归宿,它能用来合成糖原;它能通过糖酵解被分解产生 ATP 和碳原子(如乙酰 CoA),经柠檬酸循环被进一步氧化;并且能转向通过磷酸戊糖途径产生 NADPH 和(或)核糖-5-磷酸。肝脏中的 G6P 能被转化成葡萄糖,通过血液循环输出到其他组织。

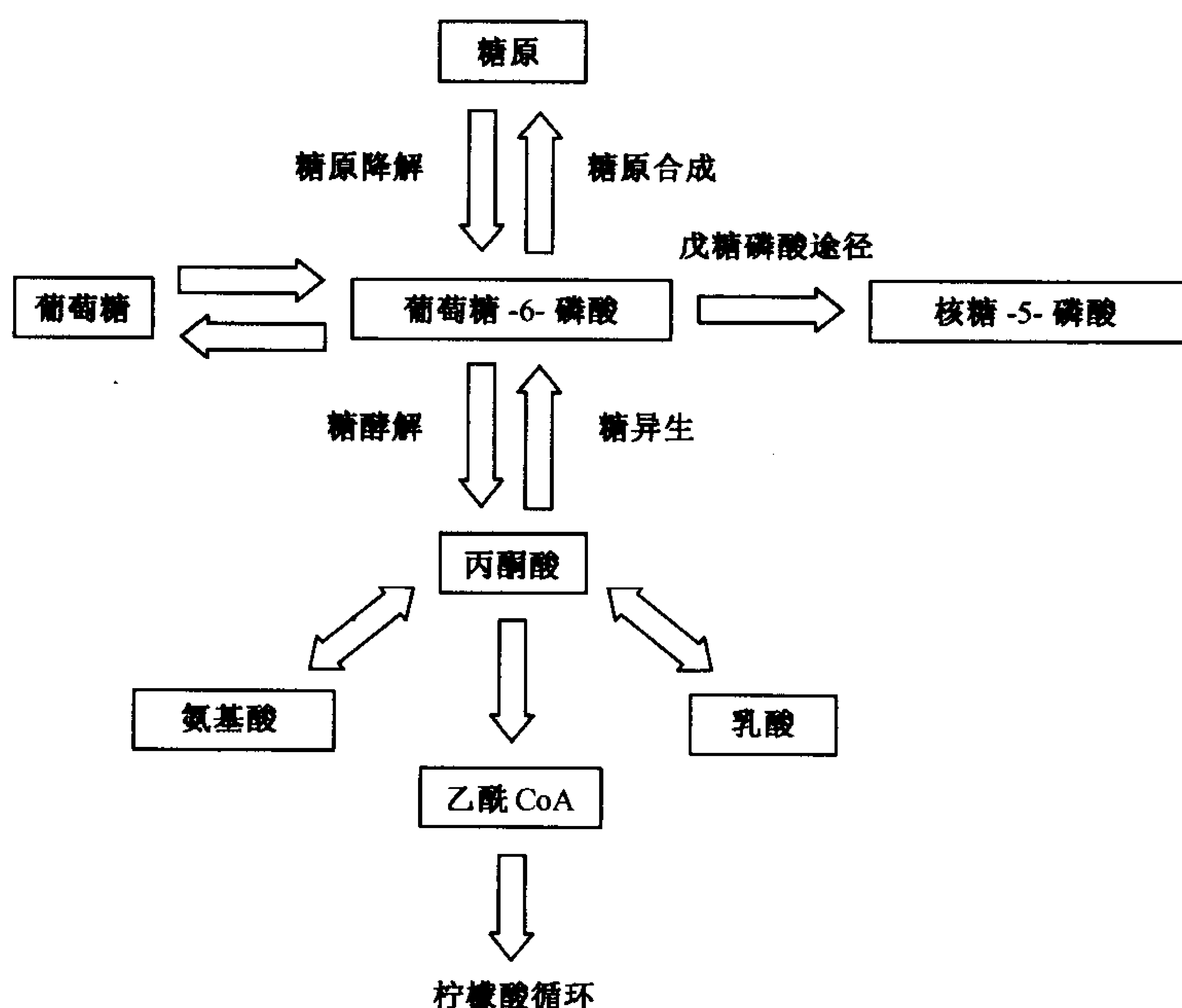


图 15-1　葡萄糖代谢概观

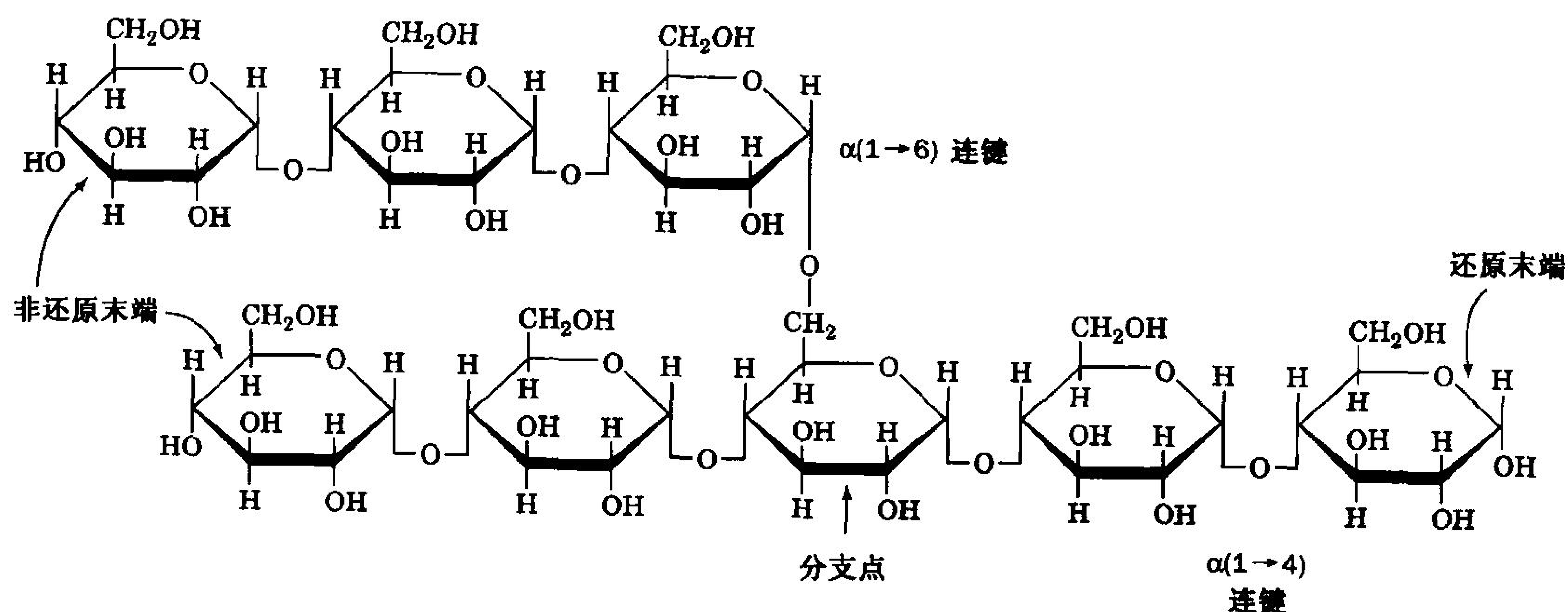
葡萄糖-6-磷酸是通过游离葡萄糖的磷酸化作用、糖原降解作用以及糖异生作用产生的,它也是糖原合成和戊糖磷酸途径的前体。肝能水解 G6P 为葡萄糖,葡萄糖经糖酵解代谢成丙酮酸,并能进一步分解成乙酰 CoA,被柠檬酸循环氧化。能可逆地转化成丙酮酸的乳酸和氨基酸是糖异生作用的前体。

糖原合成和降解,以及糖酵解和糖异生作用的相反过程是相互调节的,也就是说,当一个大大地打开时,另一个则大大关闭。本章中我们将审视催化糖原代谢和糖异生作用的酶的反应,特别关注保证有效操作相反代谢途径的调节机制。

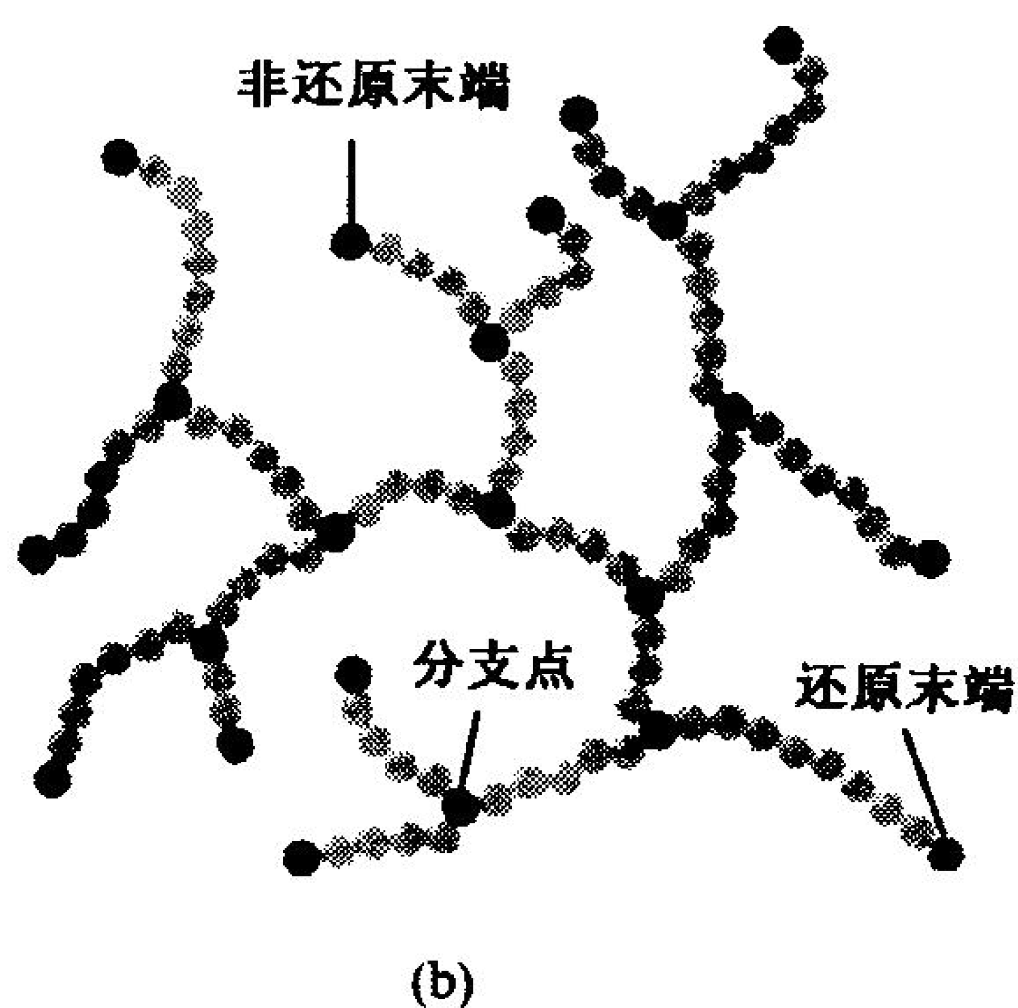
1. 糖原分解

糖原是 α(1→4)连接的 D-葡萄糖的聚合物,每 8～14 个残基有 α(1→6)连接的分支(图 15-2a,b 和节 8-2C)。糖原颗粒存在于胞内,是直径为 100～400Å 的球状分子,每个含有 120 000 个葡萄糖单位(图 15-2c)。细胞里这些颗粒是特别显眼的,利用糖原最多的组织细胞是肌肉(糖原占细胞重量的 1%～2%)和肝细胞(糖原占细胞重量的 10%,图 8-11)。糖原颗粒也含有催化糖原合成和降解的酶以及调节这些过程的许多蛋白质。

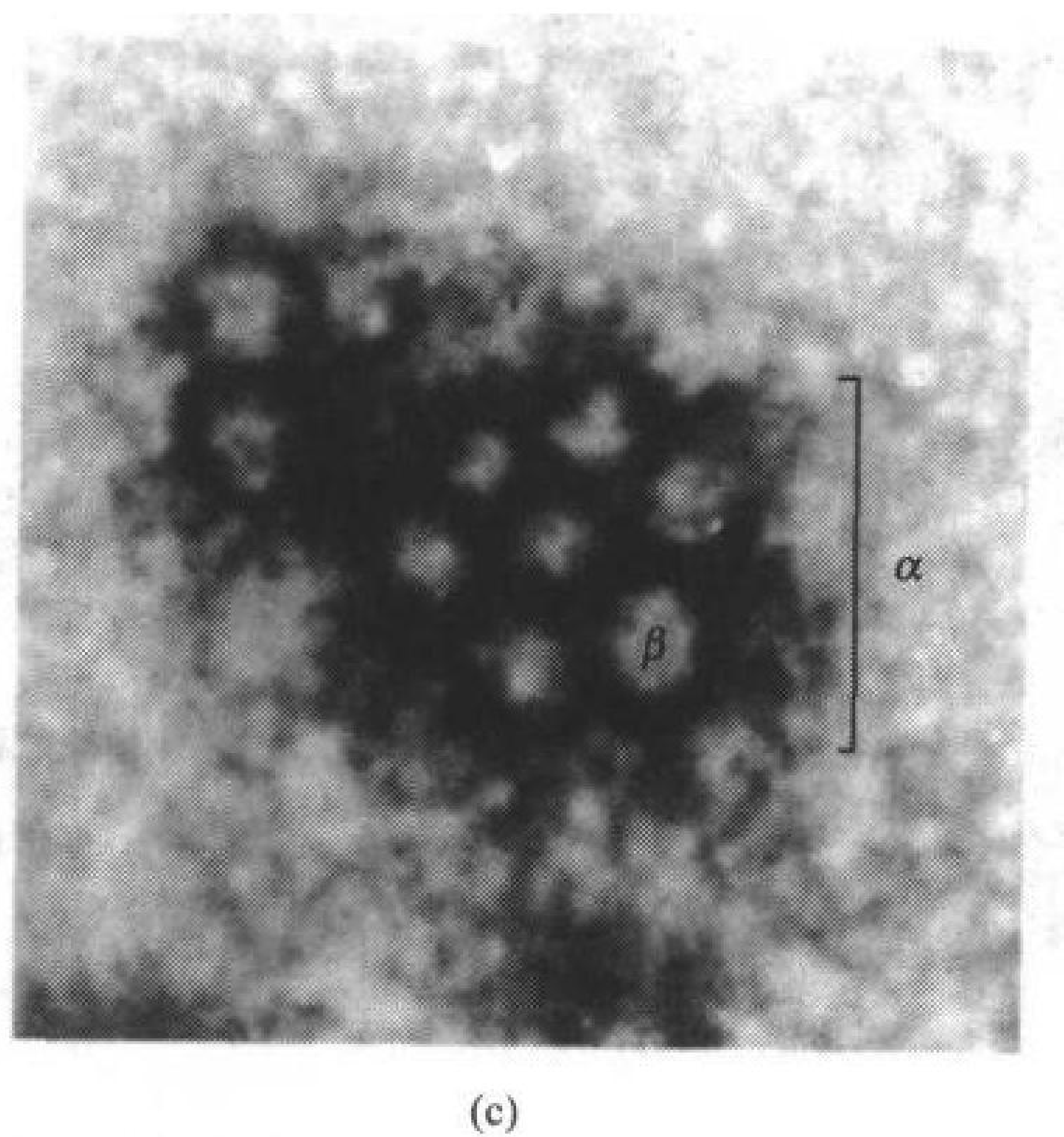
葡萄糖单位是从糖原的非还原末端(末端缺乏 C1-OH 基)逐个移去的。糖原只有一个还原末端,而每个分支有一个非还原末端。由于糖原的高度分支结构,在每个分支末端同时释放葡萄



(a)



(b)



(c)

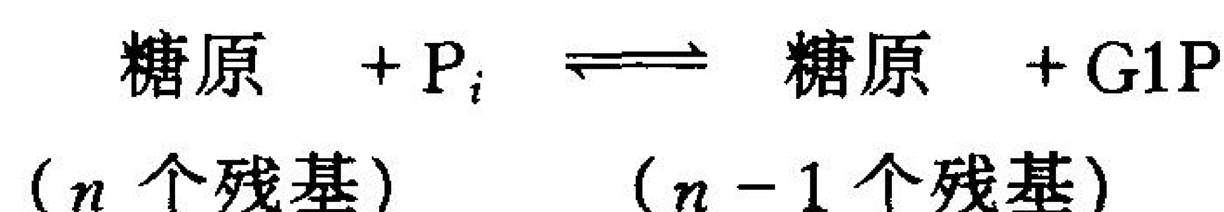
图 15-2　糖原的结构

(a)分子式,在实际的分子中每链有约 12 个残基。(b)糖原分支结构的概貌图。注意分子中有许多非还原末端但仅有一个还原末端。(c)鼠骨骼肌一个糖原颗粒的电子显微镜图,每个颗粒(标记为 α)由数个球状糖原分子(β)和结合的蛋白质组成。[引自 Calder, P.C., Int.J. Biochem.23, 1339(1991).Copyright Elsevier Science.允许使用]

糖单位使得能迅速地进行葡萄糖流通。

糖原的分解，或**糖原分解作用**(glycogenolysis)需要三个酶：

1) **糖原磷酸化酶**(glycogen phosphorylase，或简称磷酸化酶)催化糖原**磷酸解**(phosphorolysis，磷酸基的置换使键断开)产生葡萄糖-1-磷酸(G1P)。



$$\text{糖原}\ (n\ \text{个残基}) + P_i \rightleftharpoons \text{糖原}\ (n-1\ \text{个残基}) + \text{G1P}$$

该酶释放一个葡萄糖单位，条件是它至少距分支点5个单位。

2) **糖原脱支酶**(glycogen debranching enzyme)移走糖原的分支，因而使另一些葡萄糖残基更易受糖原磷酸化酶的影响。

429

3) **磷酸葡糖变位酶**(phosphiglucomutase)将G1P转变为G6P，它有几种代谢归宿(图15-1)。

A. 糖原磷酸化酶

糖原磷酸化酶是相同的842个残基(97kDa)亚单位的二聚体，催化糖原分解中的限速步骤，由变构相互作用和**共价修饰**(covalent modification)(磷酸化作用和脱磷酸化作用)来调节。该酶的磷酸化形式**磷酸化酶 a** 有一磷酰基与Ser14酯化，脱磷酸形式称为**磷酸化酶 b**。磷酸化酶的变构抑制剂(ATP、G6P和葡萄糖)和它的变构活化剂(AMP)与磷酸酶和脱磷酸酶进行不同的作用，形成极为灵敏的调节过程(节15-3)。

由 Robert Fletterick 和 Louise Johnson 分别测定的磷酸化酶 a 和磷酸化酶 b 的高分辨 X 射线

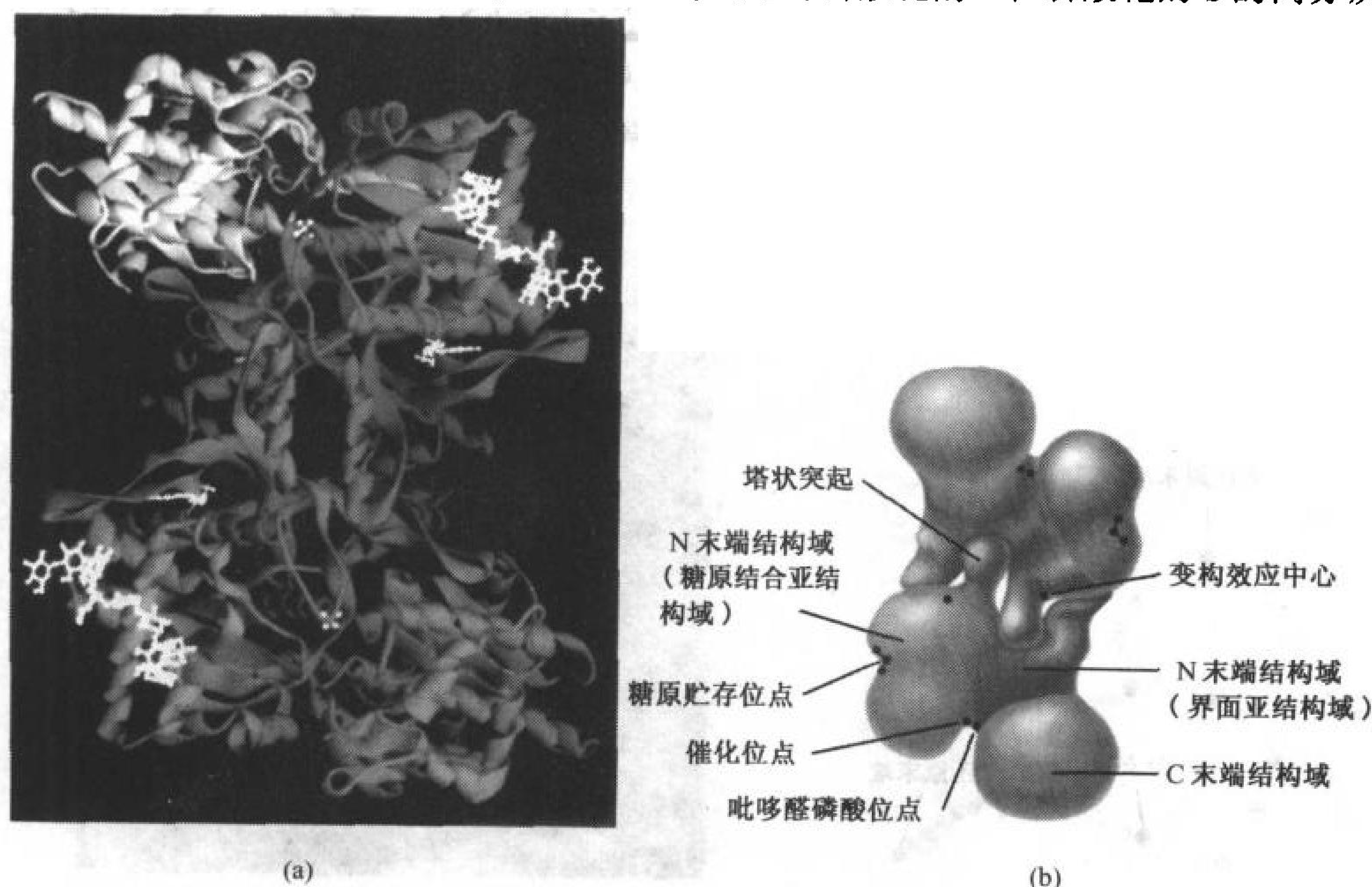
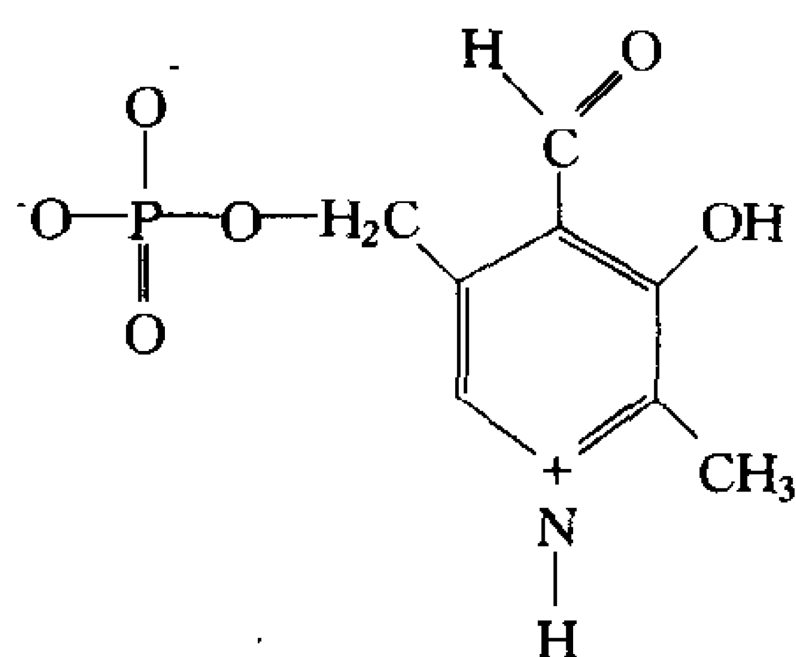


图15-3 兔肌肉糖原磷酸化酶的X射线结构

(a)沿分子双重对称轴观察磷酸化酶a二聚体的带状图，底部亚单位为橙色，而顶部亚单位的N末端和C末端区域分别以蓝色和绿色表示，各种配位结合为白色，每个亚单位中心的磷酸基显示该酶的催化位点；麦芽七糖(葡萄糖七聚体)结合在每个糖原贮存位点；而在该蛋白质“背后”的AMP证明为变构效应物位点。(引自 Steplen Sprang, University of Texas Southwestern Medical Center)(b)图a中结构的解释图，表明酶的各种配位结合位点。

结构是相似的。这两个结构都有一个大的 N 末端区域(484 个残基;最大的已知区域)和一个较小的 C 末端区域(图 15-3)。N 末端区域包括磷酸化位点(Ser14)、变构效应物位点、一个与糖原结合的位点(称为糖原贮存位点)以及该二聚体中所有亚单位间的触点。催化位点位于亚基的中心。

磷酸化酶单体表面上一个约 30Å 长的裂隙将糖原贮存位点与活化位点连接起来。因为该裂隙能容纳一条链上 4 个或 5 个糖残基但对于容纳分支的寡糖而言却太窄,这就给磷酸化酶不能分解距分支点近于 5 个单位的糖基提供了明确的物理依据。据推测,糖原贮存位点增加磷酸化酶的催化效率,这是由于允许磷酸化酶磷酸化相同糖原颗粒上的许多葡萄糖残基而无需在催化循环之间进行完全的解离和重新组合。



431

磷酸化酶与活化时所需的辅因子**吡哆醛-5′-磷酸**(**PLP**,见右)结合。这个辅基是**维生素 B_6** 的衍生物,通过它的醛基和 Lys 680 的 ε-氨基之间形成的希夫碱(亚胺)与酶共价连接。PLP 也存在于氨基酸代谢的各种酶内,PLP 的共轭环系用以催化离域电子(节 20-2A 和节20-4A)。然而只有磷酸基作为一个普通的酸-碱催化剂在磷酸化酶中参与催化。糖原的磷酸解作用按随机机制进行(节 12-1D),包括一个酶·P_i·糖原三元复合体。当 C1—O1 键裂开时形成一个氧鎓离子中间物,有如溶菌酶催化的反应那样(节 11-4B)。反应机制见图 15-4,表明 PLP 的磷酸基的参与是作为一个普遍的酸-碱催化剂。

糖原磷酸化酶构象的变化

磷酸化酶的活性(R)和失活(T)构象之间的结构差别(图 15-5)从变构的对称模型(节 7-2)的角度已有相当好的了解。T 状态的酶有一个隐藏的活性位点,因而对其底物亲和力低,而 R 状态的酶有一个易接近的催化位点和一个高亲和力的磷酸结合位点。

AMP 促进磷酸化酶 T(失活的)→R(活性的)构象的转移是由于它在变构效应物位点与酶的 R 状态相结合,此时,AMP 的腺嘌呤、核糖和磷酸基结合到多肽链的分开部分,与活性位点、亚单位界面以及 N 末端区域连接,而后者从在 T 状态酶的位置作了大的构象转移(导致 Ser 14 的 36Å 移动)。AMP 的结合也引起糖原磷酸化酶的塔螺旋倾斜(图 15-3 和图 15-5)并拉开以更利于装填,这些三级运动触发协同的 T→R 转变,它主要由两个亚单位约 10°的相对旋转所组成。

432

塔螺旋的运动替代并弄乱覆盖 T 状态活性位点的一个圈,以避免基质进入。塔螺旋运动也使 Arg 569 支链(它的位置在靠近 PLP 和 P_i 结合部位的活性位点)旋转以增加该酶对其阴离子 P_i 底物结合的亲和力(图 15-5)。

ATP 也与变构效应物位点相连,但在 T 状态中,它抑制而非促进 T→R 构象转变,这是因为 ATP 的 β-和 γ-磷酸基妨碍了它的核糖和 α-磷酸基的适当排列,这种适当排列导致 AMP 引起的构象变化。

磷酸化作用和脱磷酸化作用能改变酶的活性在某种意义上暗示了变构调节。磷酸基有双倍的负电荷(这一性质与天然存在的氨基酸残基不同),并且它共价连接到蛋白质上,能诱导巨大的构象变化。磷酸化酶中 Ser 14 的磷酸化作用引起三级和四级结构变化,因为 N 末端片段的运动使磷酸-Ser 与两个阳离子 Arg 残基形成离子对。Ser 14-磷酰基的存在导致与 AMP 结合相似的

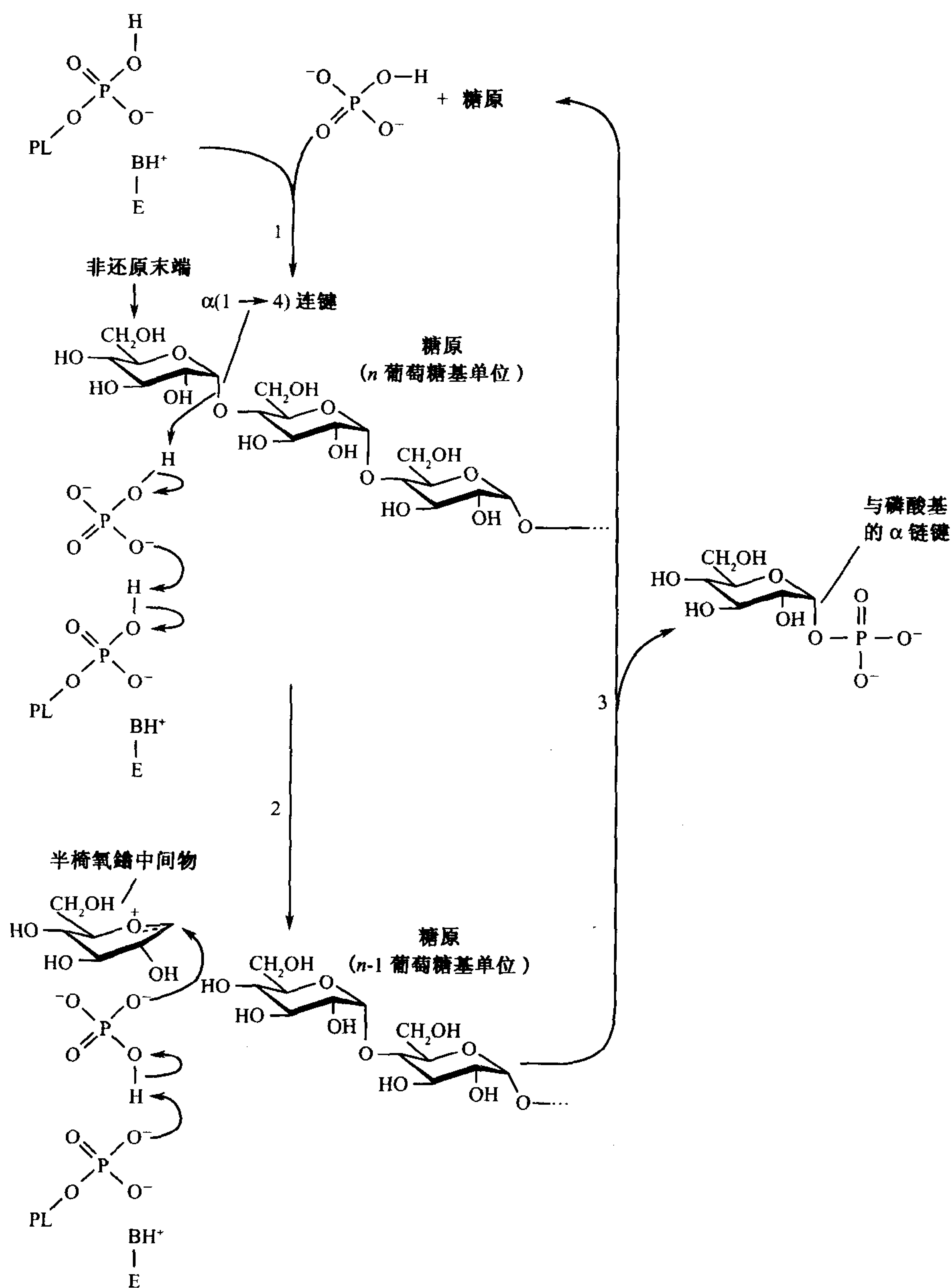


图 15-4　糖原磷酸化酶的反应机制

PL 是一个与酶结合的吡哆醛基；BH^+ 是带正电的氨基酸支链，可能是 Lys 586 的支链，为维持 PLP 电中性所需。(1)形成 E·P_i·糖原三元复合体。(2)从 α 连接的末端葡糖基形成盾形的氧鎓离子中间物，涉及 PLP 转移质子促进 P_i 的酸催化，此氧鎓离子具有半椅式构象。(3)P_i 与氧鎓离子反应，全部保留 C1 构型，形成 α-D-葡萄糖-1-磷酸。比先前少了一个残基的糖原循环回到步骤 1。

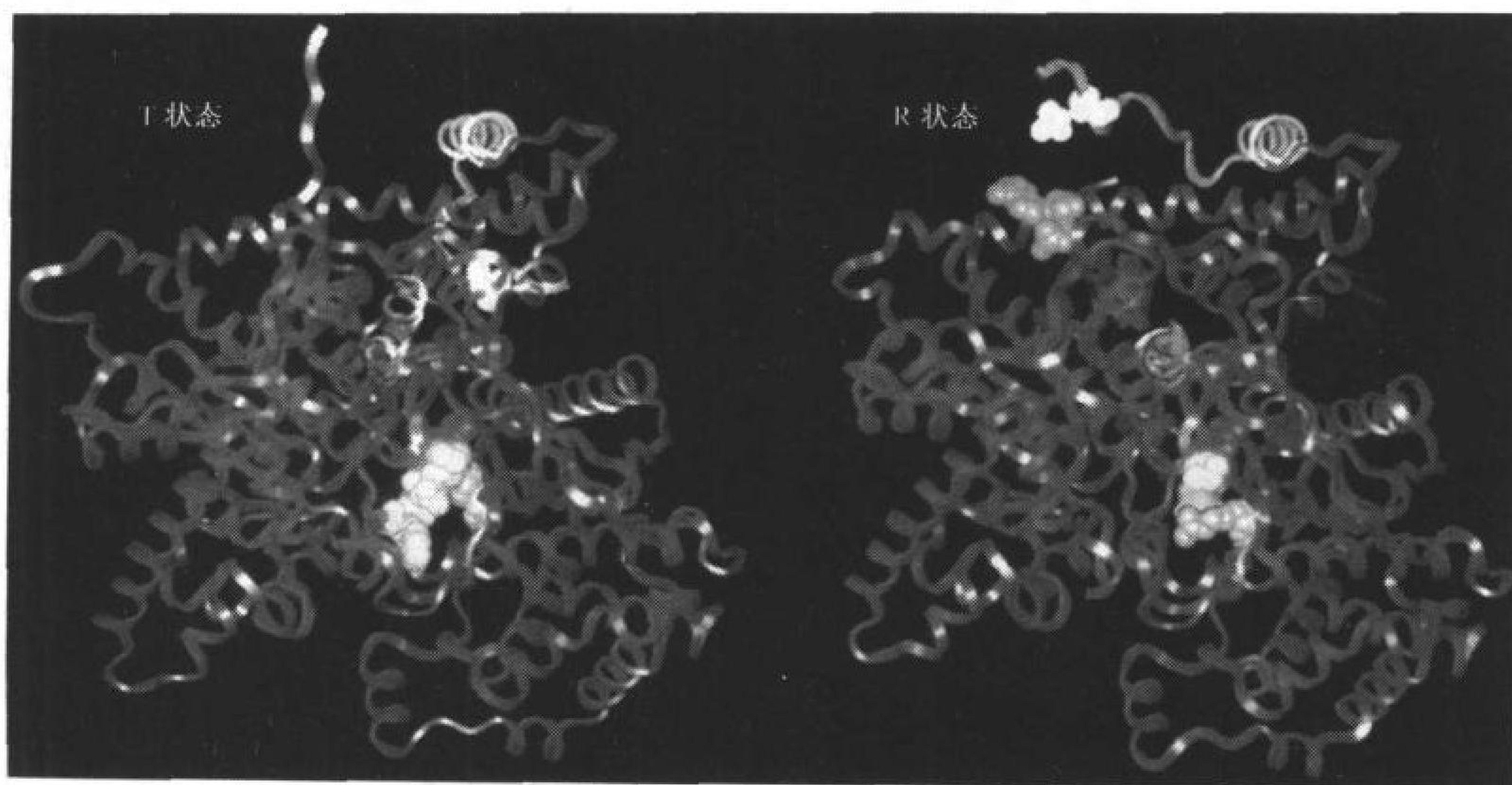


图 15-5　糖原磷酸化酶中构象的变化

二聚化的磷酸化酶 b 的一个亚单位不存在变构效应物时的 T 状态表示在左，而与 AMP 结合的 R 状态表示在右。本图是图 15-3 中较低的(橙色)亚单位从页面的顶部看的结果，塔螺旋是蓝色，N 末端螺旋是青绿色，因与 AMP 结合而改变构象的 N 末端残基是绿色。以空间充填物模型表示的基团中，Ser 14，磷酸化位点，是亮绿色；AMP 是橙色；活性位点 PLP 是红色；Arg 569 支链，在 T→R 转变中再定向以与底物磷酸相互作用，是青绿色。圈状残基 282 到 284 在 R 状态大体上是混乱的，因而看不见，是白色；而磷酸无论在活性位点还是在 R 状态 Ser14 磷酸化位点(不存在于磷酸化酶 b 但表示位置)是黄色。

*构象变化，因而改变酶的 T⇌R 平衡以有利于 R 状态。*这就说明了磷酸化酶 b 需要 AMP 来活化而 a 型的活性无需 AMP。当我们讨论糖原合成与糖原降解平衡的机制时再回顾磷酸化酶活性的调节(节 15-3)。

B. 糖原脱支酶

磷酸解作用沿一个糖原分支进行直到靠近距 α(1→6)分支点四或五个残基，剩下一个“有限支”。糖原脱支酶的作用像 **α(1→4)转葡糖基酶**(transglycosylase，糖基转移酶)一样从糖原一个有限支转移 α(1→4)连接的三糖到另一个分支的非还原末端上(图 15-6)。这个反应形成的新的 α(1→4)键带有三个以上的单位以利于磷酸化酶催化的磷酸解作用。将分支遗留的糖基与主链连接的 α(1→6)键被相同的脱支酶水解(不是磷酸解)产生葡萄糖和脱支的糖原。糖原中约 10% 的残基(分支点的那些)因而被转化成葡萄糖而非 G1P。*脱支酶对于转移酶和 α(1→6)葡糖苷酶反应有各自的活性位点。*在同一个酶上存在两个独立的催化活性无疑会改善脱支过程的效率。

糖原磷酸化酶反应的最大速率远大于糖原脱支反应。因此，糖原最外面的分支(构成近半数的残基)在高度代谢要求的条件下，在肌肉中降解只有数秒钟。糖原降解超过这一点需要脱支，因而缓慢得多。这也部分地说明肌肉能持续其最大的努力仅数秒钟。

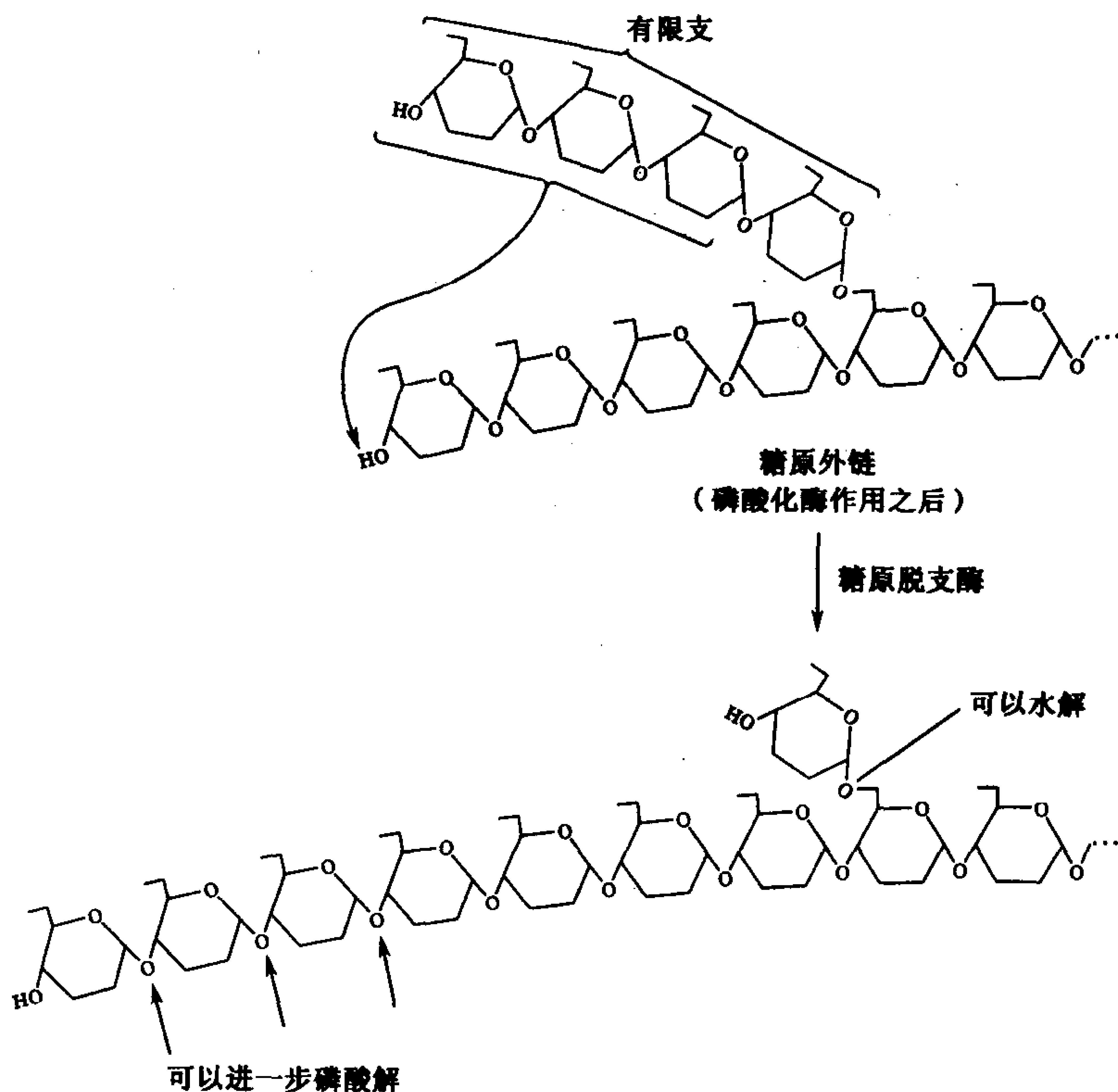


图 15-6 脱支酶催化的反应

酶从糖原一个“有限支”转移末端三个 α(1→4)连接的葡萄糖残基到另一支的非还原末端，遗留在分支点残基的 α(1→6)键被脱支酶的进一步作用水解产生游离的葡萄糖，新加长的支易被糖原磷酸化酶降解。

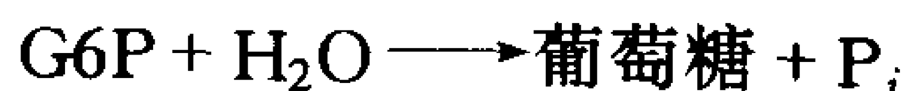
C. 磷酸葡糖变位酶

磷酸化酶将糖原的糖基单位转变成 G1P，它反过来被磷酸葡糖变位酶转变成 G6P。磷酸葡糖变位酶反应与磷酸甘油酸变位酶催化的反应（节 14-2）相似。一个磷酸基从活化的磷酸酶转移到 G1P，形成**葡萄糖-1，6-二磷酸（G1，6P）**，然后再磷酸化该酶产生 G6P（图 15-7；这个近平衡反应也是可逆的）。该酶与磷酸甘油酸变位酶之间的一个重要区别是磷酸葡萄糖变位酶中磷酸基与 Ser 羟基共价相连，而不是与 His 咪唑氮相连。

434

肝脏中葡萄糖-6-磷酸酶产生葡萄糖

由糖原分解产生的 G6P 能沿着糖酵解途径或磷酸戊糖途径继续下去（注意葡萄糖已经被磷酸化，所以消耗 ATP 的己糖激酶催化的葡萄糖磷酸化作用被旁路）。在肝脏中产生的 G6P 也便于被其他组织利用。因为 G6P 不能通过细胞膜，它首先被**葡萄糖-6-磷酸酶**（glucose-6-phosphatase）水解。



$$G6P + H_2O \longrightarrow 葡萄糖 + P_i$$

生成的葡萄糖离开细胞并被血液带到其他组织。肌肉和其他组织缺少葡萄糖-6-磷酸酶，因此保留它们的 G6P。

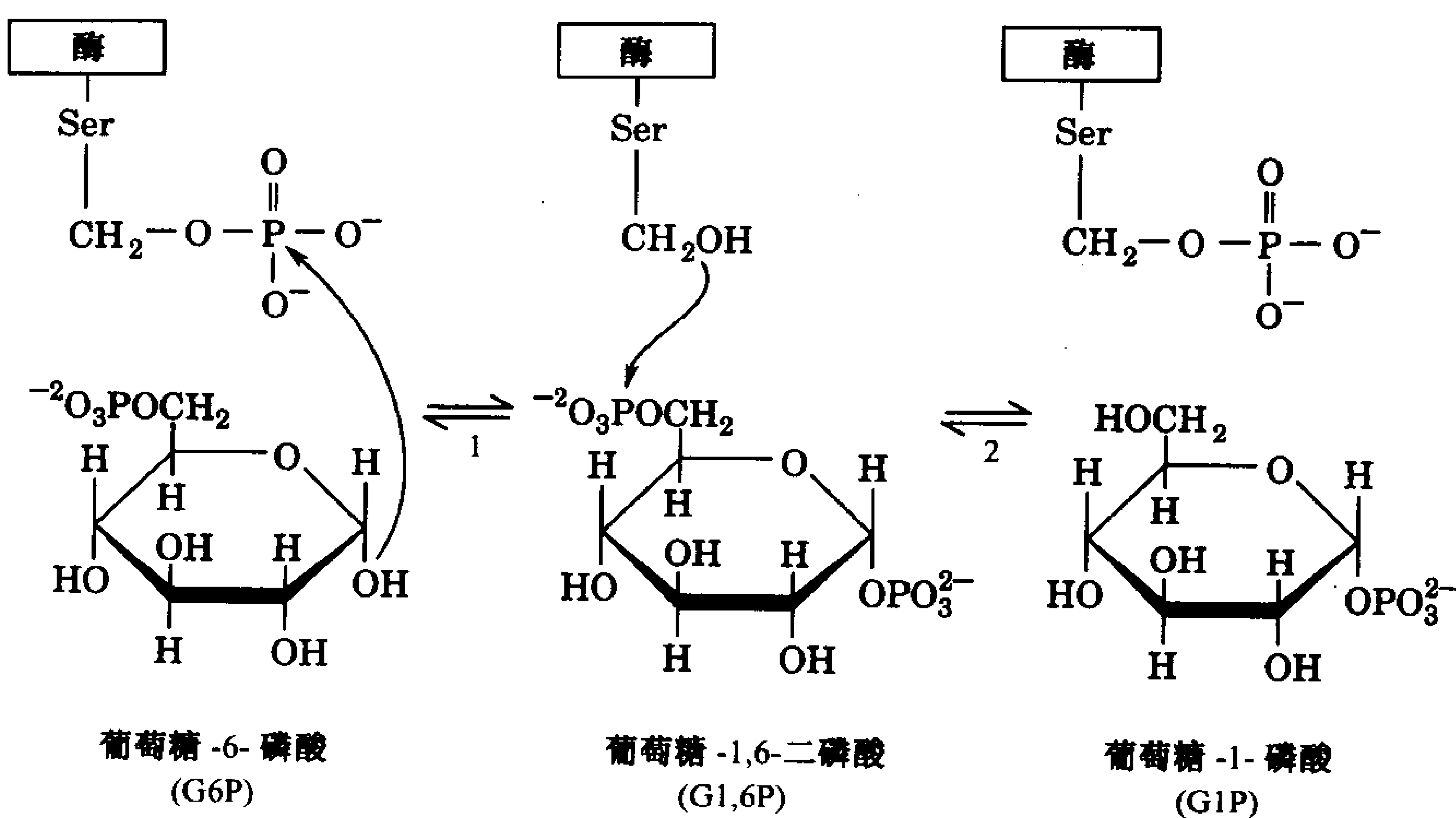


图 15-7　磷酸葡糖变位酶

(1)G6P 的 C1 上的 OH 基与磷酸酶作用形成脱磷酸酶-G1,6P 中间物。(2)脱磷酸酶上的 Ser OH 基作用于 C6 的磷酰基,再生磷酸酶并形成 G1P。

2. 糖原合成

糖原磷酸化酶反应的 $\Delta G^{\circ\prime} = +3.1\ \mathrm{kJ \cdot mol^{-1}}$,但在生理条件下糖原分解是放能的($\Delta G = -8 \sim -5\ \mathrm{kJ \cdot mol^{-1}}$)。因此在生理条件下,从 G1P 合成糖原如没有自由能输入在热力学上是不利的。所以,*糖原合成和分解必须由独立的途径来完成*。当这两条途径必须在类似的生理条件下操作时,这种轮回代谢策略——生物合成和降解代谢途径是不同的——特别重要。假如一条途径正是另一条的可逆途径,这种情况在热力学上是不可能的。

然而,导致认可糖原合成和降解途径的区别不是热力学,而是 McArdle's 病。患此病的人缺少肌肉糖原磷酸化酶活性因而不能分解糖原。然而他们的肌肉含有适度高量的普通糖原。很明显,糖原合成不需要糖原磷酸化酶。我们在本节将叙述参与糖原合成的三个酶:**UDP-葡萄糖焦**

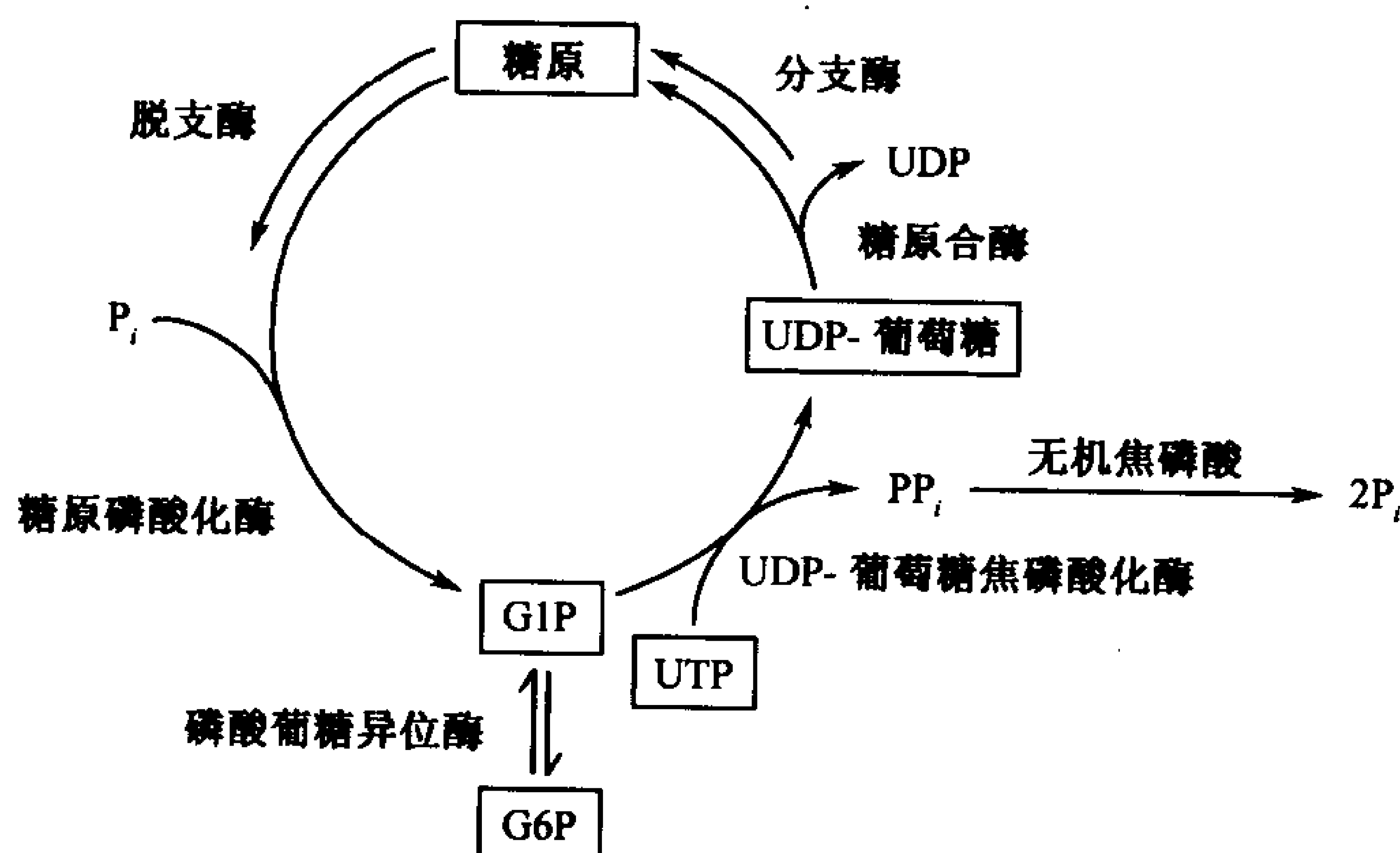


图 15-8　糖原合成和降解的对立途径

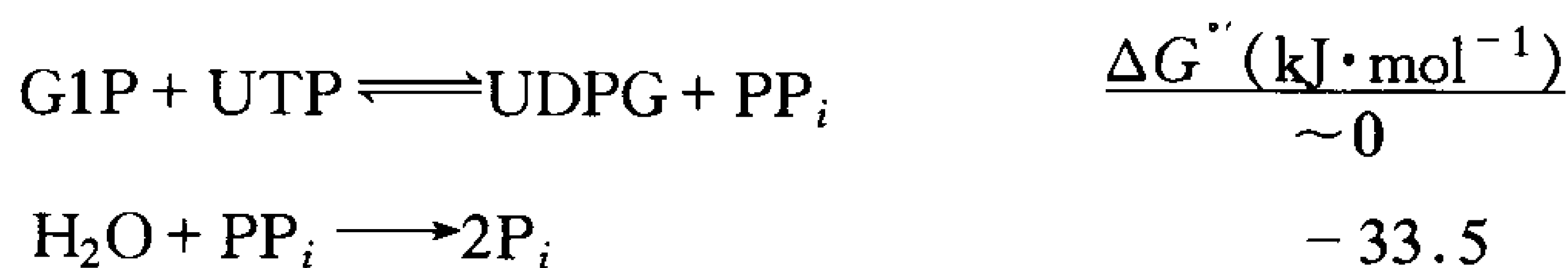
糖原分解的放能过程被使用 UTP 来产生 UDP-葡萄糖中间物的过程逆转。

磷酸化酶(UDP-glucose pyrophosphorylase)、**糖原合酶**(glycogen synthase)以及**糖原分支酶**(glycogen braching enzyme)。糖原合成和降解的对立反应用图 15-8 表示。

435

A. UDP-葡萄糖焦磷酸化酶

因为在生理条件下直接转化 G1P 成糖原和 P_i 在热力学上是不利的(正的 ΔG),糖原生物合成需要一个放能步骤。如 Luis Leloir 在 1957 发现,它的实现是靠 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶催化的尿苷三磷酸(UTP)与 G1P 的结合(图 15-9)。该反应的产物**尿苷二磷酸葡萄糖(UDP-葡萄糖或 UDPG)**是一个"活化的"化合物,它能将一个葡糖基单位给生长着的糖原链。UDPG 本身的形成 $\Delta G^{\circ\prime}\approx 0$(它是一个磷酸酐交换反应),但是其后由普遍的酶——无机焦磷酸酶放能水解 PP_i 使总反应是放能的:



		$\Delta G^{\circ\prime}$ ($kJ\cdot mol^{-1}$)
	$G1P + UTP \rightleftharpoons UDPG + PP_i$	~0
	$H_2O + PP_i \longrightarrow 2P_i$	-33.5
总反应	$G1P + UTP + H_2O \longrightarrow UDPG + 2P_i$	-33.5

这是普通生物合成策略的一个例子,分解核苷三磷酸形成 PP_i。PP_i 水解的自由能再用来驱动

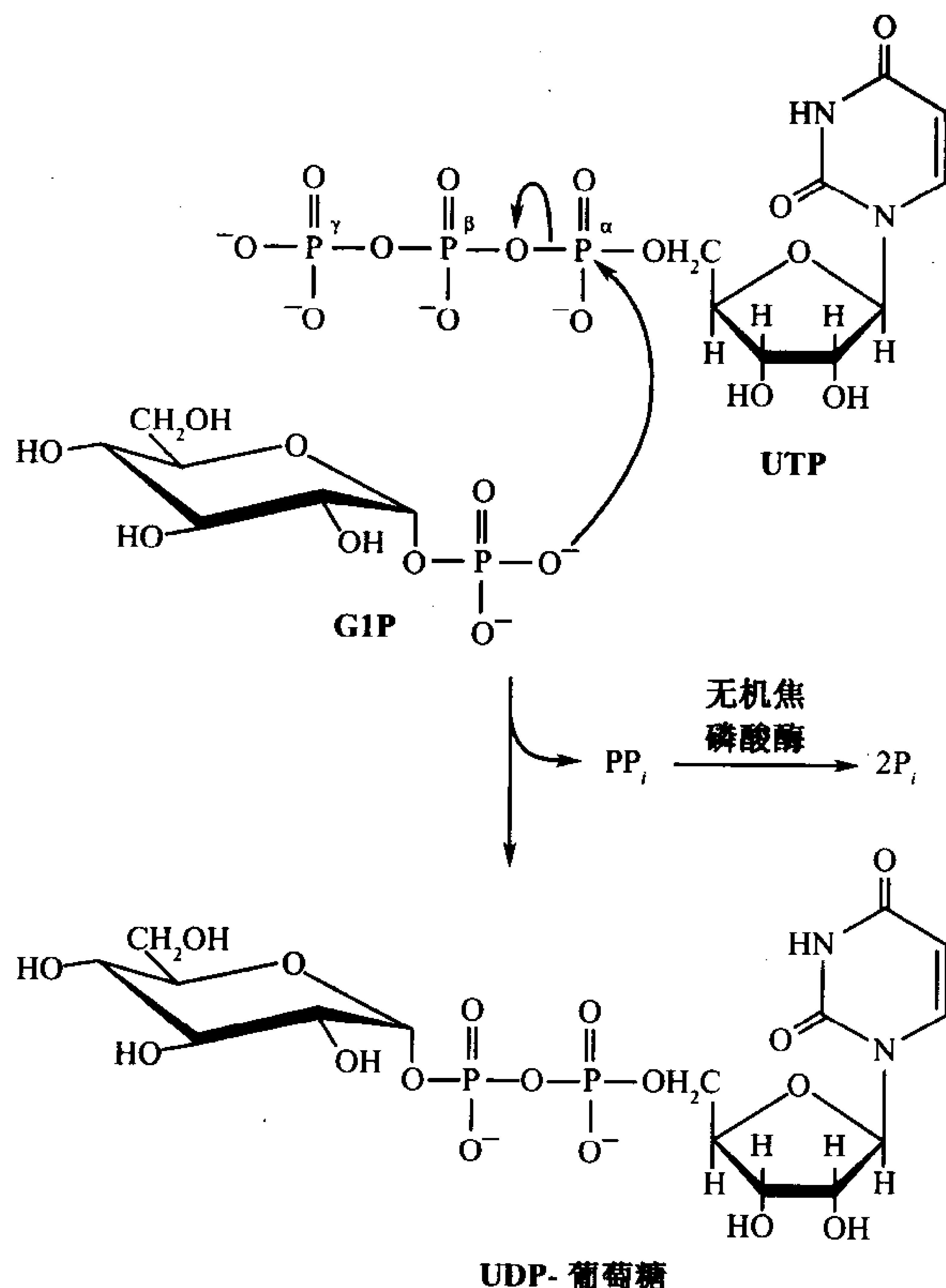


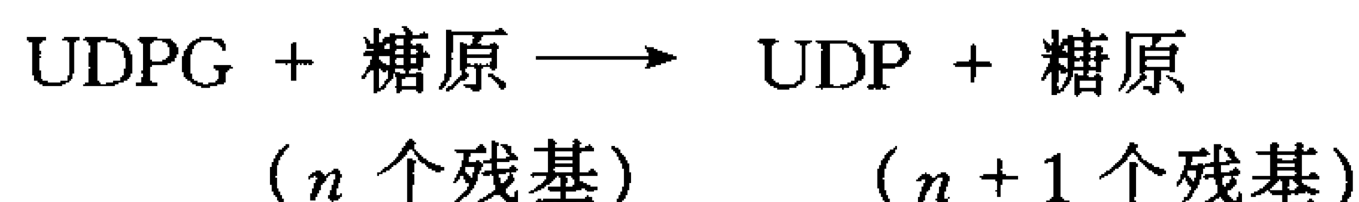
图 15-9 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶催化的反应

在这个磷酸酐交换反应中,G1P 的磷酰基氧作用于 UTP 的 α-磷原子形成 UDPGPP$_i$。PP_i 被无机焦磷酸酶迅速水解。

其他方面不利的反应使之完成(节 13-2)。　436

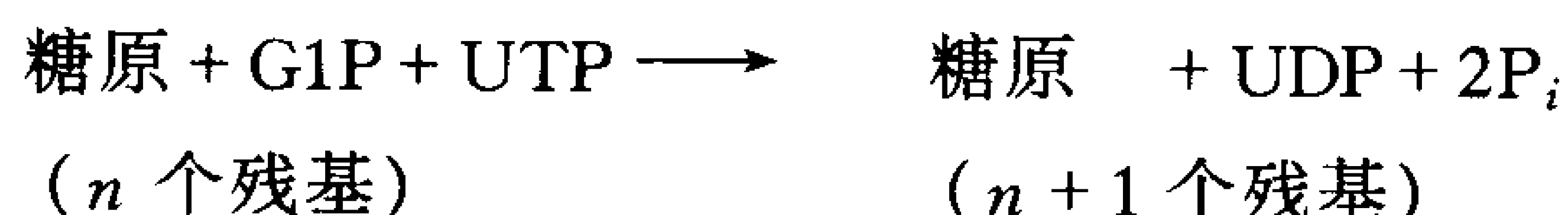
B. 糖原合酶

糖原合成的下一步骤是糖原合酶反应,UDPG 的葡糖基单位转移给糖原非还原末端上的 C4 上羟基形成一个 α(1→4)糖苷键。该糖原合酶催化的反应



$$\text{UDPG} + \underset{(n\ \text{个残基})}{\text{糖原}} \longrightarrow \text{UDP} + \underset{(n+1\ \text{个残基})}{\text{糖原}}$$

的 $\Delta G^{\circ\prime}$ 是 $-13.4\ \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$,使总反应自发进行,在相同条件下,糖原被糖原磷酸化酶分解也是自发的。然而,糖原合成确有价值。将糖原合成的前两个反应合并,得到



$$\underset{(n\ \text{个残基})}{\text{糖原}} + \text{G1P} + \text{UTP} \longrightarrow \underset{(n+1\ \text{个残基})}{\text{糖原}} + \text{UDP} + 2\text{P}_i$$

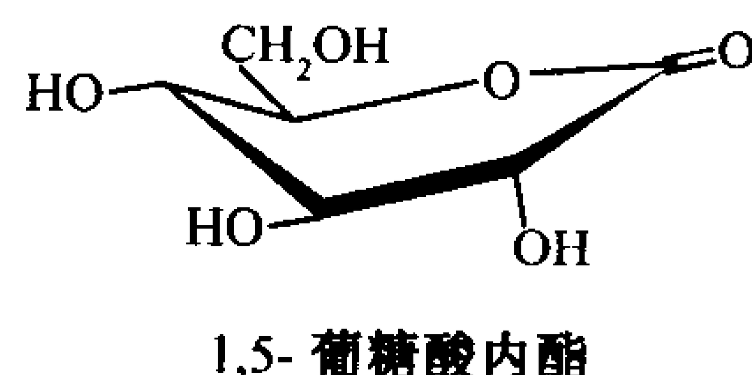
因此每一个葡萄糖残基结合到糖原上去时,一分子 UTP 分裂成 UDP。UTP 则通过由核苷二磷酸激酶调节的磷酰基转移反应补充(节 13-2C):



$$\text{UDP} + \text{ATP} \rightleftharpoons \text{UTP} + \text{ADP}$$

所以 UTP 消耗量与 ATP 消耗量相等。

一个葡糖基单位从 UDPG 转移到生长着的糖原链上时由于去除 UDP 导致形成葡萄糖基氧鎓离子(图 15-10)。该酶被 **1,5-葡糖酸内酯**(1,5-gluconolactone)抑制;它是一个类似物,与氧鎓离子的半椅式几何构象极为相似。这个相同的类似物抑制糖原磷酸化酶(节 15-1A)和溶菌酶(节 11-4B),它们有着相似的机制。



1,5-葡糖酸内酯

人肌肉的糖原合酶是 737 残基亚单位的同型四聚体(肝的同工酶有 703 个残基的亚单位)。像糖原磷酸化酶那样,它有两种能相互转化的酶型,然而,在这种情况下,磷酸化的 b 型活性较小,而本来的(脱磷酸化的)a 型活性较大。(注意:对于易共价修饰的酶,"a"表示较大活性的酶型,而"b"表示较小活性的酶型。)

糖原合酶是受变构控制的;它被生理浓度的 ATP、ADP 以及 P_i 强烈地抑制。事实上活体里磷酸化酶几乎是完全失活的,然而脱磷酸酶能被 G6P 活化,所以细胞的糖原合酶活性随[G6P]以及酶中脱磷酸型的分数而变。糖原合酶磷酸化型和脱磷酸型相互转化的机制细节是复杂的,并且不像糖原磷酸化酶那样已很好的了解(还有值得注意的一点,糖原合酶有多个磷酸化作用的位点)。我们将在节 15-3B 进一步讨论糖原合酶的调节。　437

糖原素引发糖原合成

糖原合酶不能简单地把两个葡萄糖残基连接在一起,它只能延伸一个已经存在的 α(1→4)连接的葡聚糖链。那么,糖原合成是如何开始的? 在糖原合成的第一步,**酪氨酸葡糖基转移酶**(tyrasine glucosyl transferase)将一个葡萄糖残基附着到一个 37kDa 称为**糖原素**(glycogenin)的蛋白质的 Tyr 194 OH 基上。糖原素然后自动催化延伸葡聚糖链,由 UDPG 提供 7 个补加的残基,形成一个糖原"引物"。仅仅在这时糖原合酶通过延伸该引物开始糖原合成。分析糖原颗粒表明,每个糖原分子仅仅与 1 分子糖原素及糖原合酶相联合。

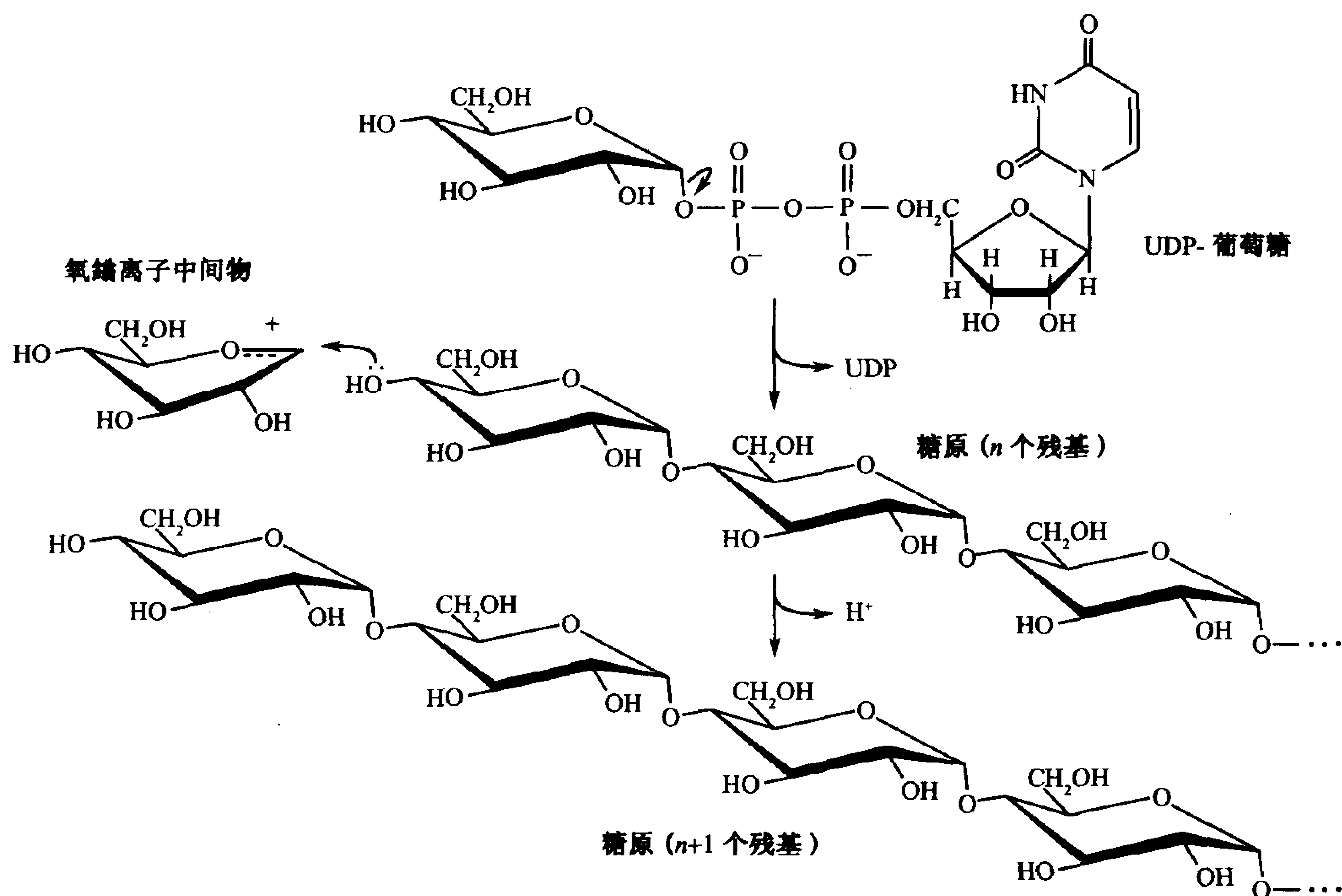


图 15-10 糖原合酶催化的反应
该反应导致葡糖基氧鎓离子中间物。

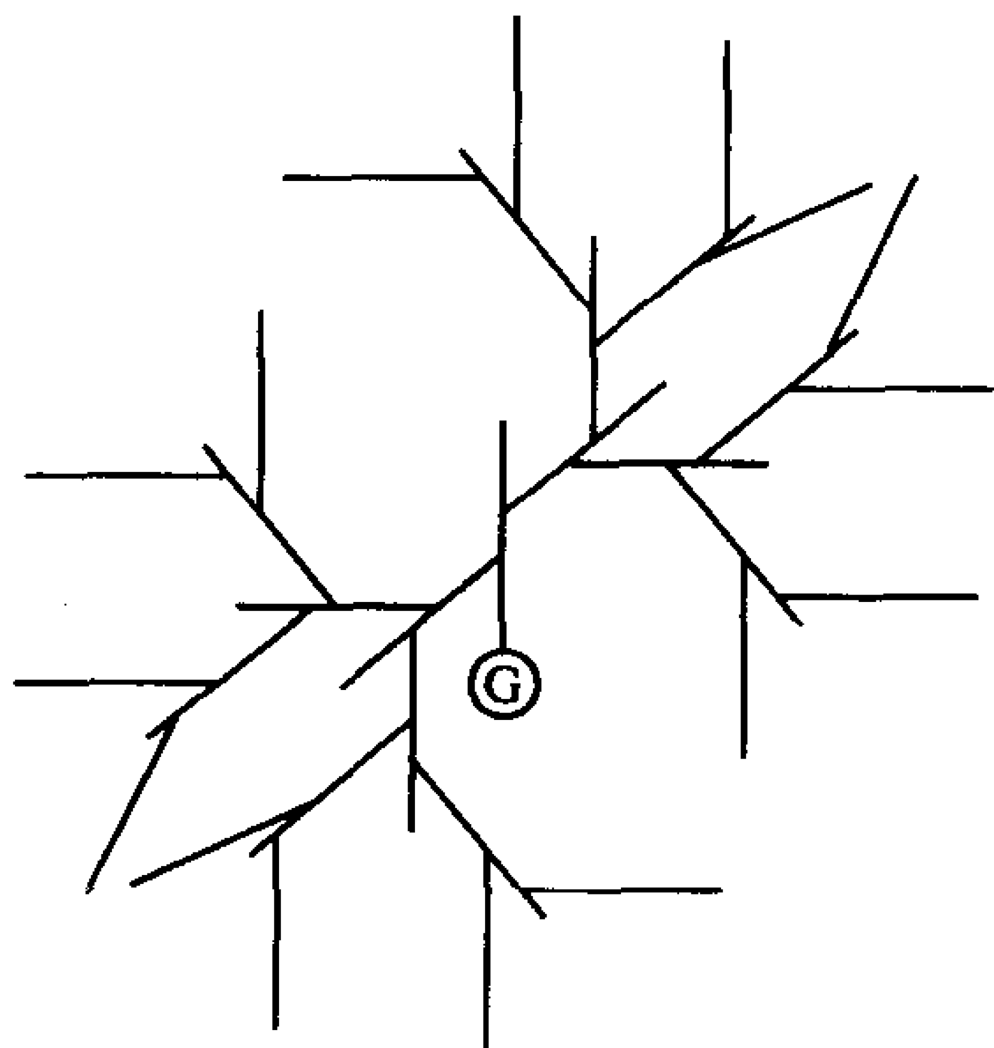
C. 糖原分支酶

糖原合酶仅仅引起 α(1→4)连接产生 α-直链淀粉。分支型或糖原是由单独的酶—**淀粉(1,4→1,6)转葡糖基酶(分支酶)**实现的，它与糖原脱支酶(节 15-1B)不同。一个分支的建立是通过从

框 15-1 生物化学相关内容

优化糖原结构

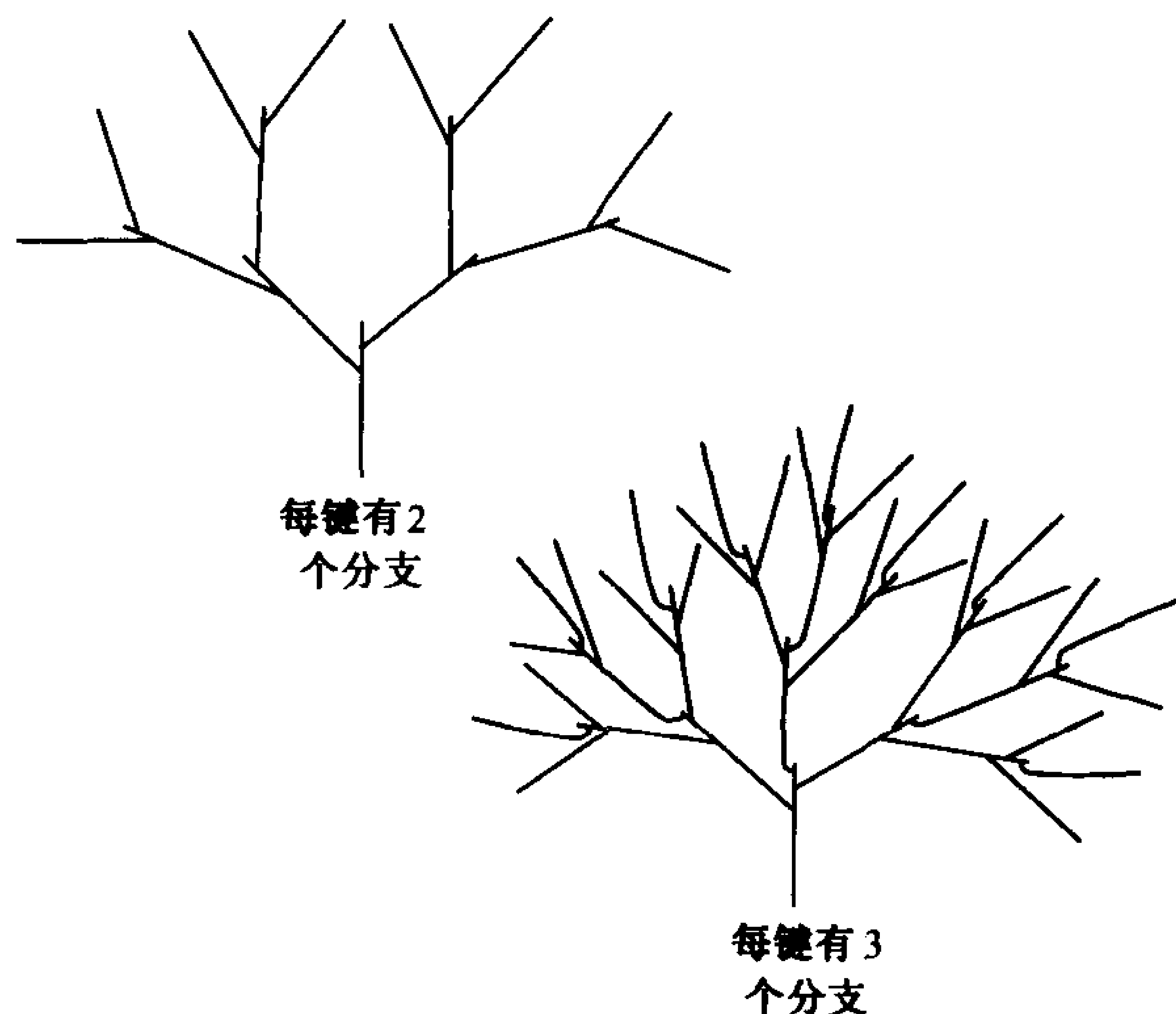
动物细胞中糖原的功能是贮存代谢燃料葡萄糖并且当需要时迅速地释放它。糖原必须是一个聚合物，因为没有胞内渗透压的剧烈增加，游离葡萄糖本身不能被贮存(节 2-1D)。现已估算糖原贮存的葡萄糖残基在一个肝细胞的总浓度是约 0.4mol·L^{-1}，然而糖原的浓度仅仅是约 10mmol·L^{-1}，这种巨大的差别减缓了渗透压力。



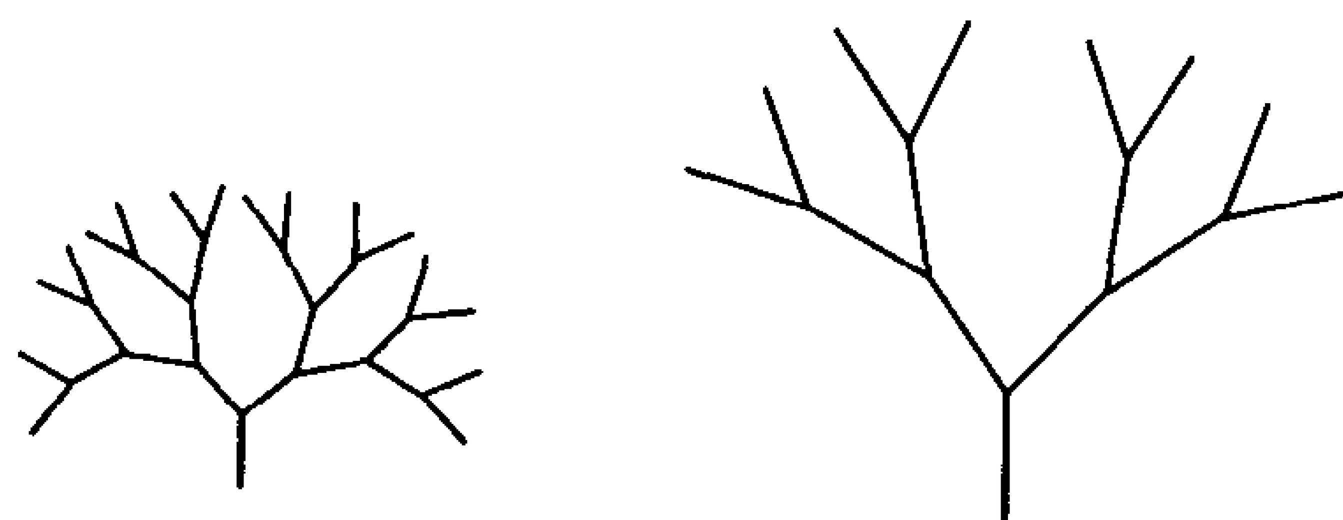
要实现其生物学功能，糖原聚合物必须在最小可能的容积中储存最大量的葡萄糖，同时易被糖原磷酸化酶释放的葡萄糖的量和非还原末端的数目要最大(葡萄糖残基被利用的速率最大)。要符合所有这些标准，必须优化两个变数：分支的程度和链长。

此处图示一个糖原分子中的糖原链，从最里面附着在糖原素 G 上的链开始，有两个分支(最外面的链不分支)，整个分子是粗略的球状组织成层。成熟的糖原估计有 12 层(图中表示仅 4 层)。

以每链两个分支,在一给定层中链的数目是前边的链数的两倍,而最外面的层含约一半的总葡萄糖残基(不管层数)。当分支的程度增加时,例如每链 3 个分支,最外层残基的比例增加,但这样也增加葡萄糖残基的密度,这会严重地限制糖原颗粒的最大尺寸和它能容纳的葡萄糖残基的数目。因此糖原每链有约 2 个分支。



对另一变量如链长的数学分析得出最佳值为 13,这与细胞中糖原链的实际长度(8～14 残基)很一致。考虑下面表示的两个简化的糖原分子,它们含有相同数目的葡萄糖残基(线段的总长度相同)和相同的分支花样。



具有较短链的分子在给定的容积中装载较多的葡萄糖并有较多的点被磷酸化酶攻击,但在脱支必须发生之前仅有约半数的葡萄糖能释放(脱支比磷酸分解慢许多)。在较小密度的分子中,较长的链增加能被连续磷酸化的残基的数目;然而攻击点较少。很明显,13 个残基是在最短时间里动用最大量葡萄糖的一种折衷。

化学上与糖原相似的支链淀粉(节 8-2C)是一个大得多的分子,并有较长的链。直链淀粉完全没有分支。很明显,淀粉不像糖原,不能当作快速动用的代谢燃料。

[引自 Meléndez-Hevia, E., Waddell, T.G., 和 Shelton, E.D., Biochem. J. 295, 477～483(1993)]

一条链的末端转移 7 个残基的片段到相同的或者另一条糖原链上葡萄糖残基的 C6OH 基(图 15-11)。每个被转移的片段必须来自至少 11 个残基的链,并且新的分支点必须离其他的分支点至少 4 个残基。糖原的这种分支样式已被进化所优化,为的是有效贮存和运输葡萄糖(见框 15-1)。 438

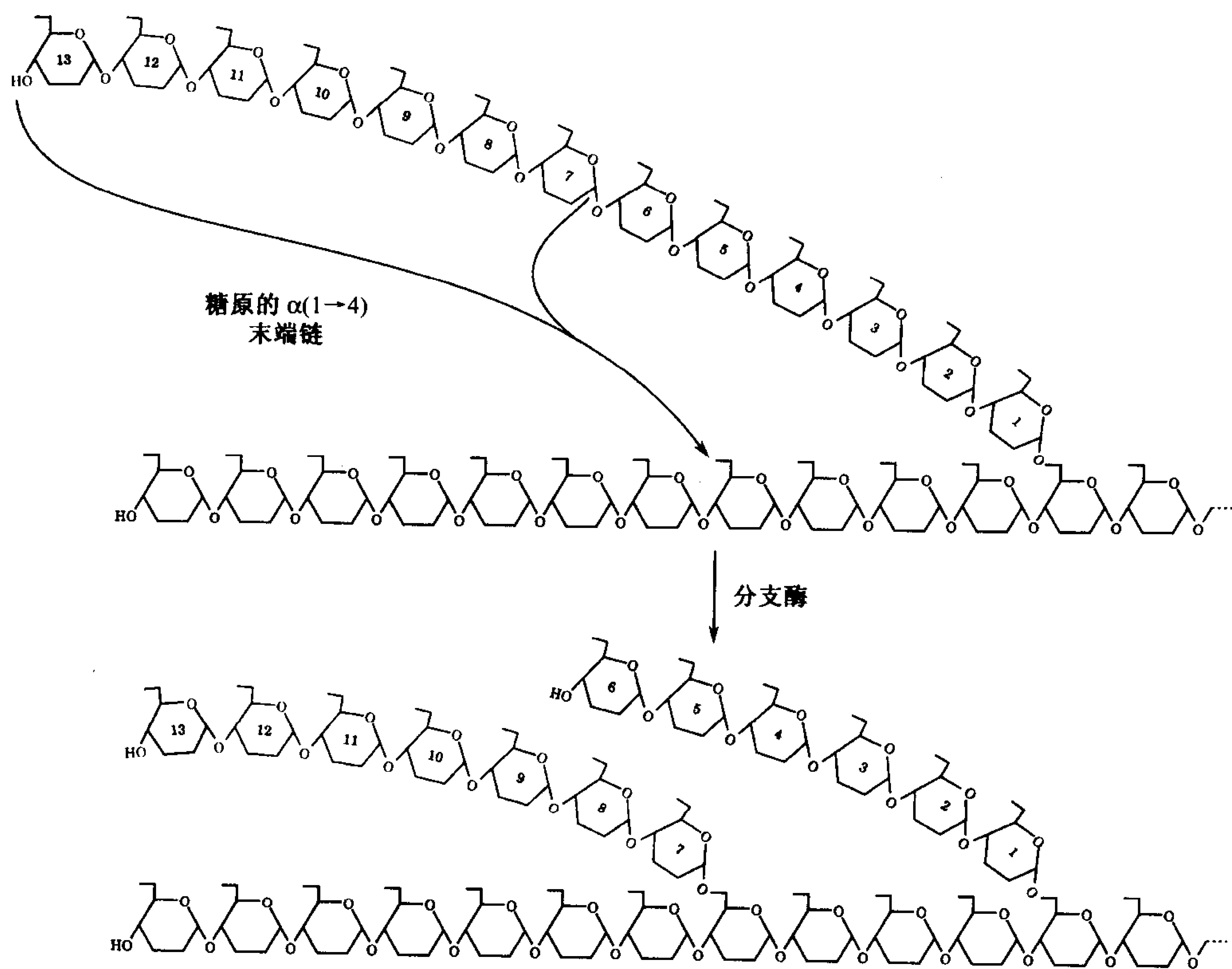


图 15-11 糖原的分支

分支的形成是从一个 α(1→4)连接的葡聚糖链转移 7 个残基的片段到同一个或另一个链上葡萄糖残基的 C6OH 基上。

3. 糖原代谢的调控

如果糖原合成和分解自发地进行，则其结果是不经济地水解 UTP，因此糖原代谢必须按照细胞的需要来调控。糖原代谢的调控包括变构调节以及代谢途径的调节酶类被共价修饰的激素调节。

A. 糖原磷酸化酶和糖原合酶的直接变构调节

正如我们在节 13-1D 和节 14-4B 看到的，反应物通过代谢途径一个步骤的通量 J 是正向和逆向反应速度 v_f 和 v_r 之差，然而当反应接近平衡时（$v_f \approx v_r$），通量随基质浓度明显变化。因此，通过一接近平衡反应的通量是几乎不能控制的。当一个远离平衡起作用的酶被一个独立控制的酶对抗时，一条途径的精确流量控制是可能的。v_f 和 v_r 独立地变化，因而 v_r 能够大于或小于 v_f，以便控制速率和方向。这种情况恰恰存在于对立的糖原磷酸化酶和糖原合酶反应的糖原代谢中。

糖原磷酸化酶和糖原合酶都被效应物 ATP、G6P 和 AMP 变构调节。肌糖原磷酸化酶被 AMP 活化而被 ATP 和 G6P 抑制。另一方面糖原合酶被 G6P 活化。这暗示当 ATP 有高的需求

时(低[ATP]、低[G6P]和高[AMP]),糖原磷酸化酶被激活而糖原合酶被抑制,这就有利于糖原分解。反之,当[ATP]和[G6P]高时,有利于糖原合成。

活体中这种变构方案叠加在基于共价修饰的另一调控系统上。例如,即使没有 AMP 的激活,磷酸化酶 a 仍是有活性的(节 15-1A),而糖原合酶基本上是失活的(节 15-2B),除非它是脱磷酸的并且存在 G6P。因此,**糖原磷酸化酶和糖原合酶的共价修饰(磷酸化作用和脱磷酸化作用)提供更精巧的调控系统,它将调节这些酶对其变构效应物的回应。**

B. 糖原磷酸化酶和糖原合酶的共价修饰

糖原合酶和糖原磷酸化酶 a 型和 b 型的相互转化是通过酶催化的磷酸化作用和脱磷酸化作用实现的,该过程受激素调控(节 15-3C)。因此酶使酶系统相互转化比简单的变构系统能对更大多数效应物作出反应。此外,如果共价修饰一个目标酶的酶本身受变构调节,有可能因小小改变修饰酶的变构效应物的浓度(例如激素刺激的结果)导致被修饰的目标酶活性大大变化。因此,一组以级联方式连在一起的激酶和磷酸酶对于信号放大和调节的适应性有巨大潜力,以应答不同的代谢信号。注意,磷酸化作用和酶的活性之间的关系随酶的不同而改变。例如,糖原磷酸化酶被磷酸作用活化(b→a),而糖原合酶被磷酸化作用失活(a→b)。相反地,脱磷酸化作用使糖原磷酸化酶失活并活化糖原合酶。

磷酸化作用活化糖原磷酸化酶

控制糖原磷酸化酶相互转化的级联由三个酶完成(图 15-12):

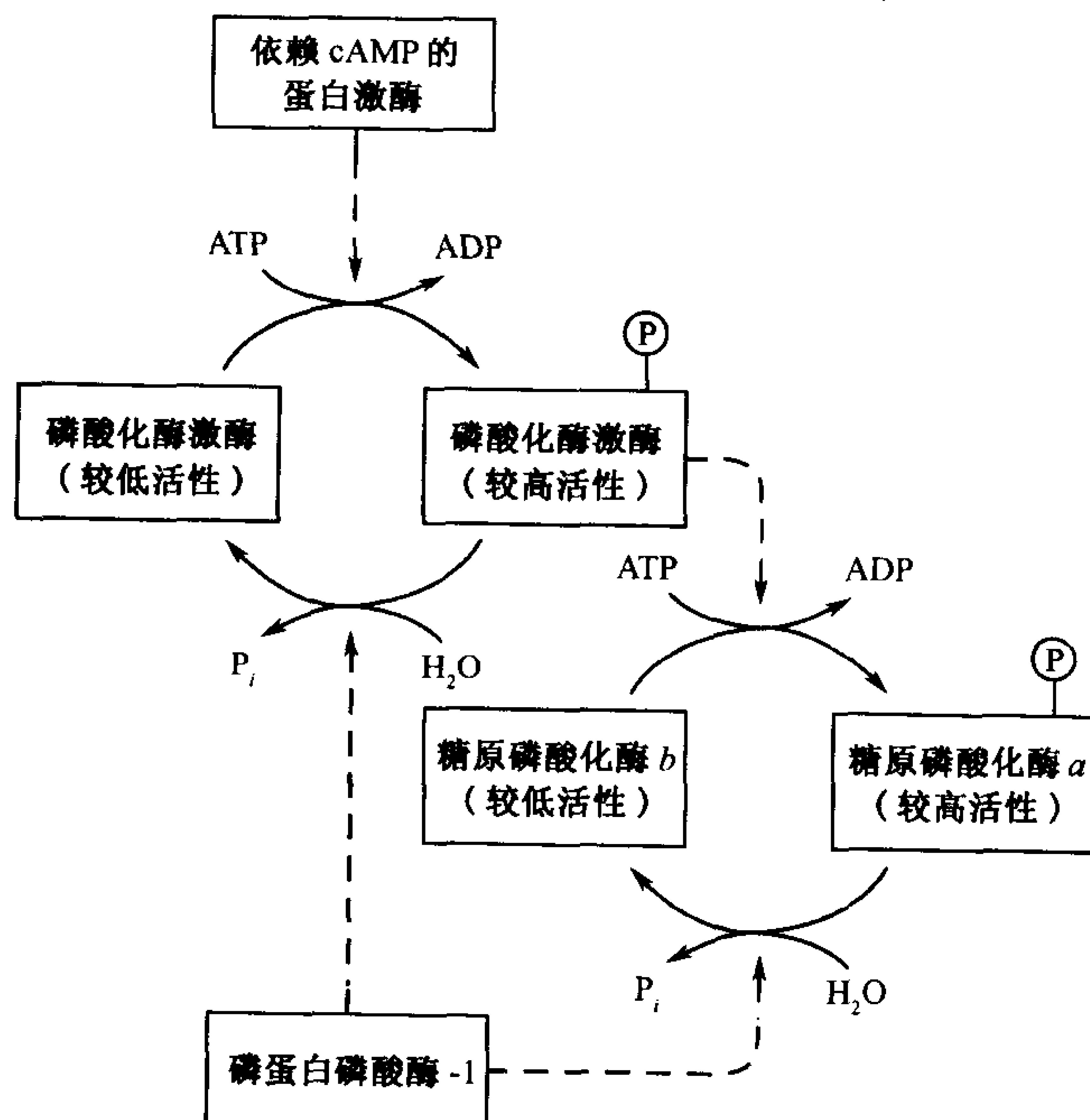


图 15-12　糖原磷酸化酶能相互转化的酶系

磷酸化酶 *b*(较低活性型)转化成磷酸化酶 *a*(较高活性型)是通过磷酸化酶激酶催化的磷酸化作用实现的。该激酶易为依赖于 cAMP 的蛋白激酶(cAPK)的磷酸化作用所活化。糖原磷酸化酶 *a* 和磷酸化酶激酶都被磷蛋白磷酸酶-1 脱磷酸化。

1）**磷酸化酶激酶**(phosphorylase kinase)，它专一地使糖原磷酸化酶 *b* 的 Ser 14 磷酸化。

2）**依赖于 cAMP 的蛋白激酶(cAPK)**，它磷酸化磷酸化酶激酶并因而使之活化。

3）**磷蛋白磷酸酶-1**(phosphoprotein phosphatase-1)，它脱磷酸化糖原磷酸化酶 *a* 及磷酸化酶激酶并因而使之失活。

磷酸化酶 *b* 对变构效应物灵敏，而磷酸化酶 *a* 没有如此灵敏(图 15-13)。在静息细胞内 441 ATP 和 G6P 的浓度高到足以抑制磷酸化酶 *b*。因此磷酸化酶活性的水平主要以磷酸化酶 *a* 存在的酶部分来决定。磷酸化酶的稳态部分依赖于磷酸化酶激酶、cAPK 以及磷蛋白磷酸酶-1 的相对活性。在我们回到糖原合酶活性的调节以前，让我们考察一下调节这些酶的活性的因素。

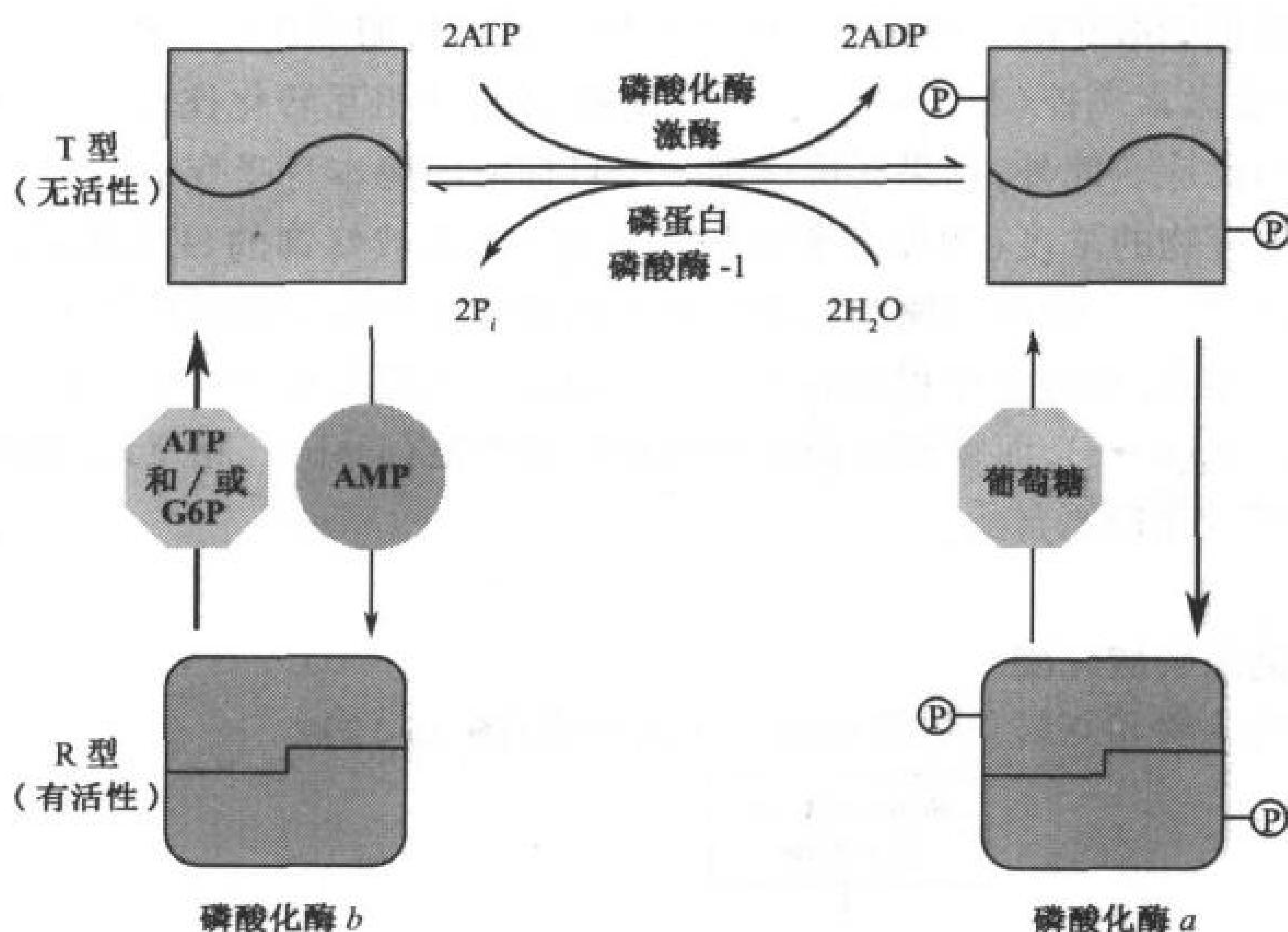


图 15-13 糖原磷酸化酶活性的调节

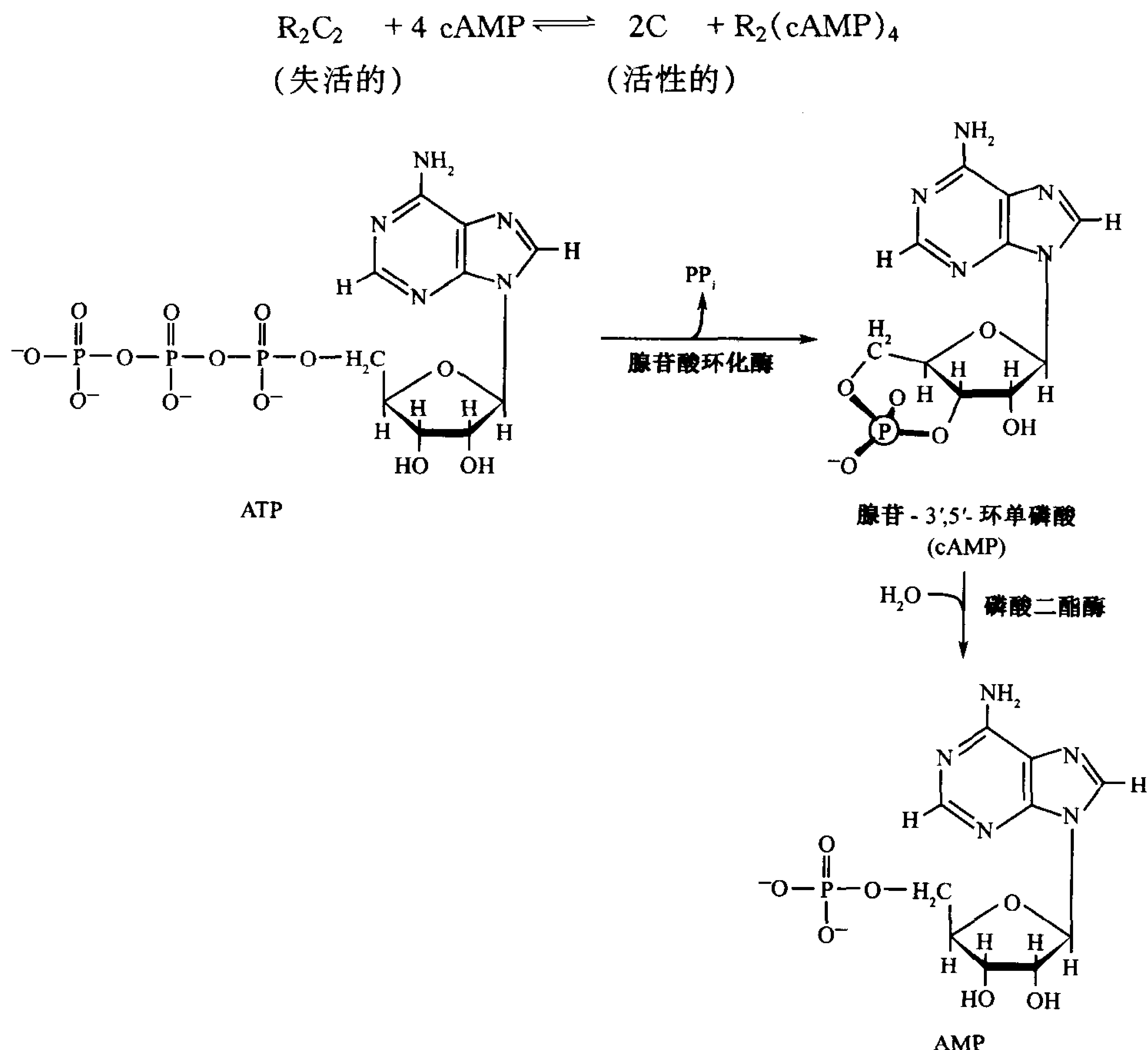
该酶可推测有酶失活的 T 构象(上方)或有催化活性的 R 型(下方)。磷酸化酶 *b* 的构象被效应物变构调节，如 AMP、ATP 和 G6P，并且在生理条件下大多数处于 T 状态。相反，该酶的修饰型磷酸化酶 *a* 几乎对这些效应物无反应，并且大多数处于 R 状态，除非有高水平的葡萄糖。在通常的生理条件下，糖原磷酸化酶的酶活性基本上取决于其修饰和非修饰作用之比。注意，只有 T 态酶易于磷酸化和脱磷酸化，所以效应物的结合影响这些修饰/非修饰作用之比。

442 **依赖于 cAMP 的蛋白激酶**

磷酸化酶激酶对糖原磷酸化活化的主要胞内信号是**腺苷-3′，5′-环单磷酸(环腺苷酸或 cAMP)**。胞内 cAMP 的浓度是**腺苷酸环化酶**(adenylate cyclase)催化从 ATP 合成它的速率与专一的**磷酸二酯酶**(phosphodiesterase)分解它成 AMP 的速率之比的函数。(见下页图)一个横跨膜的蛋白质腺苷酸环化酶被某些激素(节 15-3C)结合到它们的细胞表面受体上所激发，在细胞内催化 cAMP 的合成。

cAMP 对 cAPK 的活性是绝对必需的，cAPK 磷酸化许多细胞蛋白质包括磷酸化酶激酶和糖原合酶的特殊 Ser 或 Thr 残基。这些蛋白质都含有一个共同的激酶识别序列 Arg-Arg-X-Ser/Thr-Y，此处 Ser/Thr 是磷酸化作用位点，X 是任何的小残基，而 Y 是一个大的疏水残基。不存在 cAMP 时，cAPK 是一个失活的四聚体，由两个调节亚基和两个催化亚基 R_2C_2 组成。cAMP 与调节亚基结合使活性的催化单体解离：

$$\underset{(\text{失活的})}{R_2C_2} + 4\ cAMP \rightleftharpoons \underset{(\text{活性的})}{2C} + R_2(cAMP)_4$$



故胞内 cAMP 的浓度决定了 cAPK 活性型的比例，因而也决定了 cAPK 磷酸化其底物的速率。

鼠 cAPK 的 350 个残基的 C 亚基与 ATP 以及 20 个残基抑制剂肽复合的 X 射线结构由 Susan Taylor 和 Janusz Sowadski 测定，如图 15-14 所示。该 C 亚基与其他的激酶一样(图 14-2 和图 14-10)有二裂片。cAPK 中裂片间深的裂隙被 ATP 和抑制剂肽的一个片段占据，后者与磷酸化作用的 5 个残基共同的序列相似，除了磷酸化的 Ser/Thr 被 Ala 代替。因此，该裂隙必须含有激酶催化位点。

443

一大家族蛋白激酶在信号转导途径中起关键作用，由此许多激素、生长因子、神经递质和毒素影响它们靶细胞的功能(节 21-3)。的确，哺乳动物细胞中约 10% 的蛋白质是磷酸化的。

磷酸化酶激酶

磷酸化酶激酶是一个 1300kDa 的蛋白质，有 4 个不相同的亚基，为 α、β、γ 和 δ。γ 亚基含催化位点，而其他三个亚基具有调节功能。磷酸化酶激酶被 Ca^{2+} 和自身 α、β 亚基的磷酸化最大程度地激活。

磷酸化酶激酶的 γ 亚基含有一个 386 残基的激酶区域，它与 cAPK 在序列上有 36% 相同，并有一类似的结构(图 15-15)。该 γ 亚基不易磷酸化，某些其他的蛋白激酶也有类似情况，因为为了活化其他激酶需要磷酸化的 Ser、Thr 或 Tyr 残基在 γ 亚基中被一个 Glu 残基取代。Glu 的负电荷想来与磷酸基的存在极为相似并与靠近活性位点的一个保守的 Arg 残基相互作用。然而，

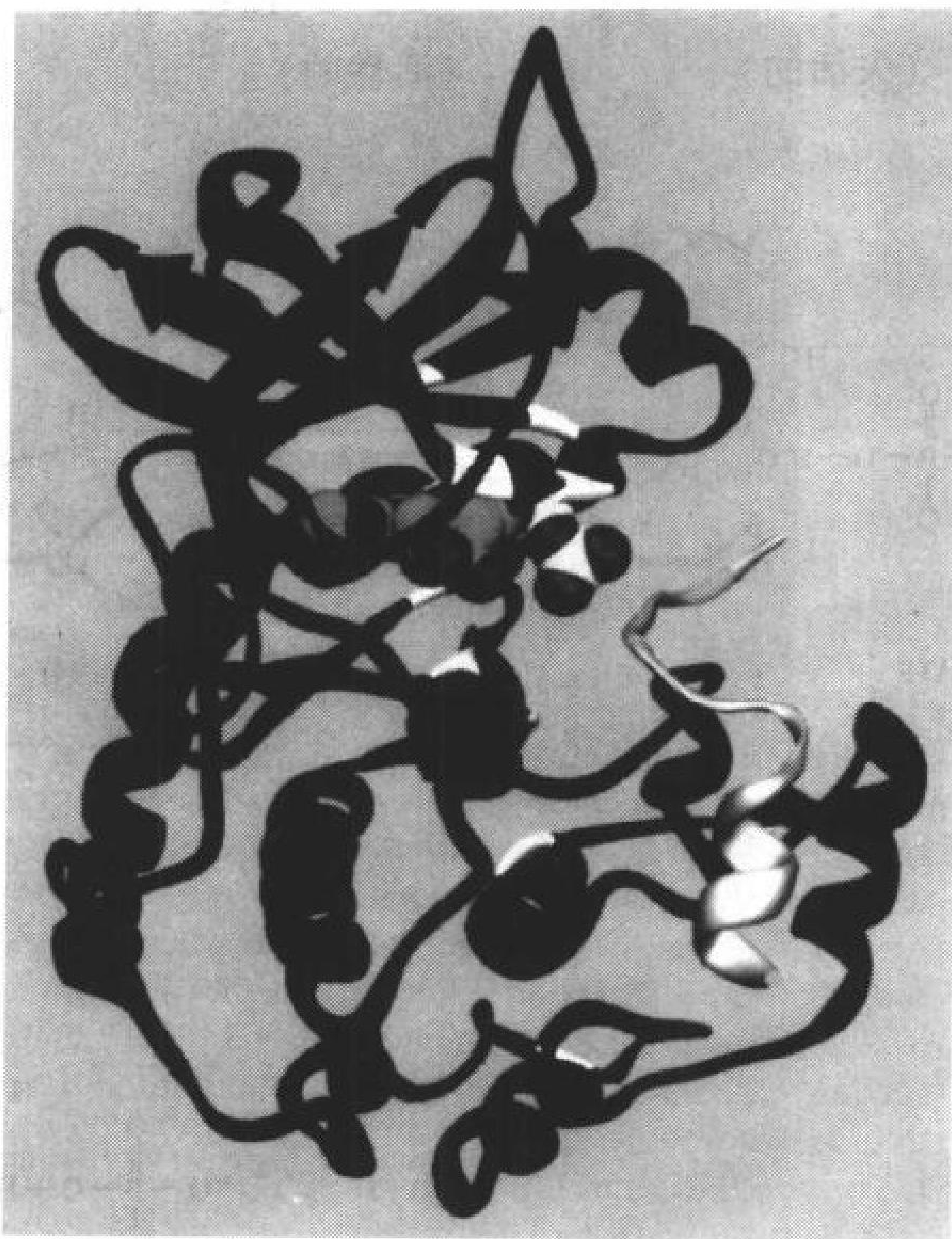


图 15-14　鼠 cAPK 的 C 亚基的结构

这个模型表示与 ATP 以及天然存在的抑制剂的 20 个残基片段复合的蛋白质。该蛋白质的主链是紫色的，其 11 个残基在所有已知蛋白激酶中是高度保守的，以白色表示。多肽抑制剂为金色，而它的假靶序列 Arg-Arg-Asn-Ala-Ile 是青绿色，其 Ala 代替能磷酸化的 Ser/Thr。ATP 用空间填充模型表示，颜色则按原子类型不同（C，绿色；N，紫色；O 红色；P 黄色）。注意抑制剂的假靶序列靠近被该酶转移的 ATP 的 r-磷酸基。（引自 Susan Taylor and Janusz Sowadski 的 X 射线结构，University of California at San Diego）

444
γ 亚基的全部催化活性由于它的 C 末端片段（不存在于图 15-15 中）与该酶活性位点结合而受到妨碍。因而这个多肽片段的作用尤如一个“假底物”阻断该激酶的活性位点，很像抑制肽阻断 cAPK 的活性位点（图 15-14）。

Ca^{2+} 浓度低到 $10^{-7}mol \cdot L^{-1}$ 时，Ca^{2+} 与 δ 亚基结合，从而活化磷酸化酶激酶。δ 亚基也称为**钙调蛋白**（calmodulin，CaM）。Ca^{2+} 的结合，如下面讨论的，诱导 CaM 构象变化，对假底物暴露出一个疏水的结合位点。因此当结合 Ca^{2+} 时，CaM 从 γ 亚基的催化位点取出假底物，因而活化该激酶。磷酸化酶激酶的 α 和 β 亚基的磷酸化在 Ca^{2+} 浓度更低时使酶活化，尽管 α 和 β 亚基调节 γ 亚基活性的机制仍不明了。

糖原磷酸化酶 *b* 通过磷酸化酶激酶的作用转变成糖原磷酸化酶 *a* 会增加糖原分解的速率。Ca^{2+} 触发这种活化的生理意义是胞液的 Ca^{2+} 水平的短暂增加也触发肌肉收缩（节 7-3C）。糖原分解的速率因而与肌肉收缩的速率联系在一起，这是关键的，因为糖原给糖酵解提供燃料以产生肌肉收缩所需的 ATP。因为 Ca^{2+} 释放的发生应答神经冲动，而磷酸化酶激酶的磷酸化作用的最终发生应答某些激素的存在，在肌肉细胞中这两个信号协同地作用以刺激糖原分解。

钙调蛋白

CaM 是普遍存在的、经常自由流动的真核生物 Ca^{2+} 结合蛋白质，它参与许多细胞调节过程。这个高度保守的 148 个残基的蛋白质，其 X 射线结构有一个独特的像哑铃的形式，两个结构相似的球状结构域由一个 7 圈的 α 螺旋连在一起(图 15-16)。

CaM 的两个球状结构域每个含有两个高亲和力 Ca^{2+} 结合位点，每个位点上的 Ca^{2+} 与氧原子呈八面体配位，这些氧原子来自骨架和支链，以及一个与蛋白质结合的水分子。每个与 Ca^{2+} 结合的位点是由几乎重叠的**螺旋-环-螺旋**形成的。称之为 **EF 手**(EF hand)(图 15-17)。EF 手在许多其他已知结构的 Ca^{2+} 敏感蛋白质中也形成 Ca^{2+} 结合位点。

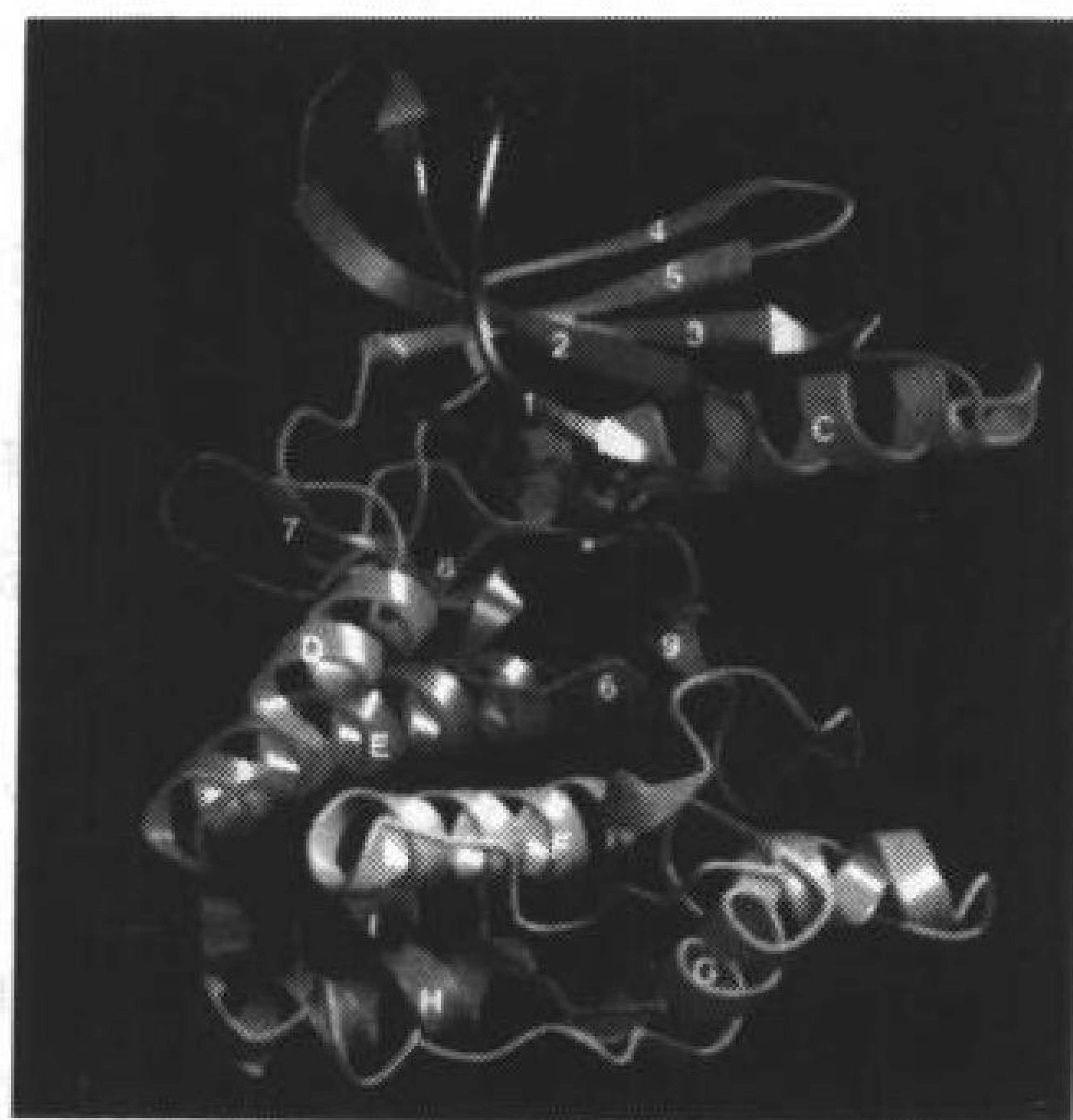


图 15-15　磷酸化酶激酶的激酶结构域的结构
该蛋白质以虹的颜色顺序表示，N 末端为蓝色而 C 末端为橙色。结合的 ATP 用不同颜色表示其原子(C 绿色；N 蓝色；O 红色；P 紫红)。两个在催化作用上重要的锰离子之一用一银球表示。
(引自 Louise Johnson, Oxford University, Oxpord, U.K)

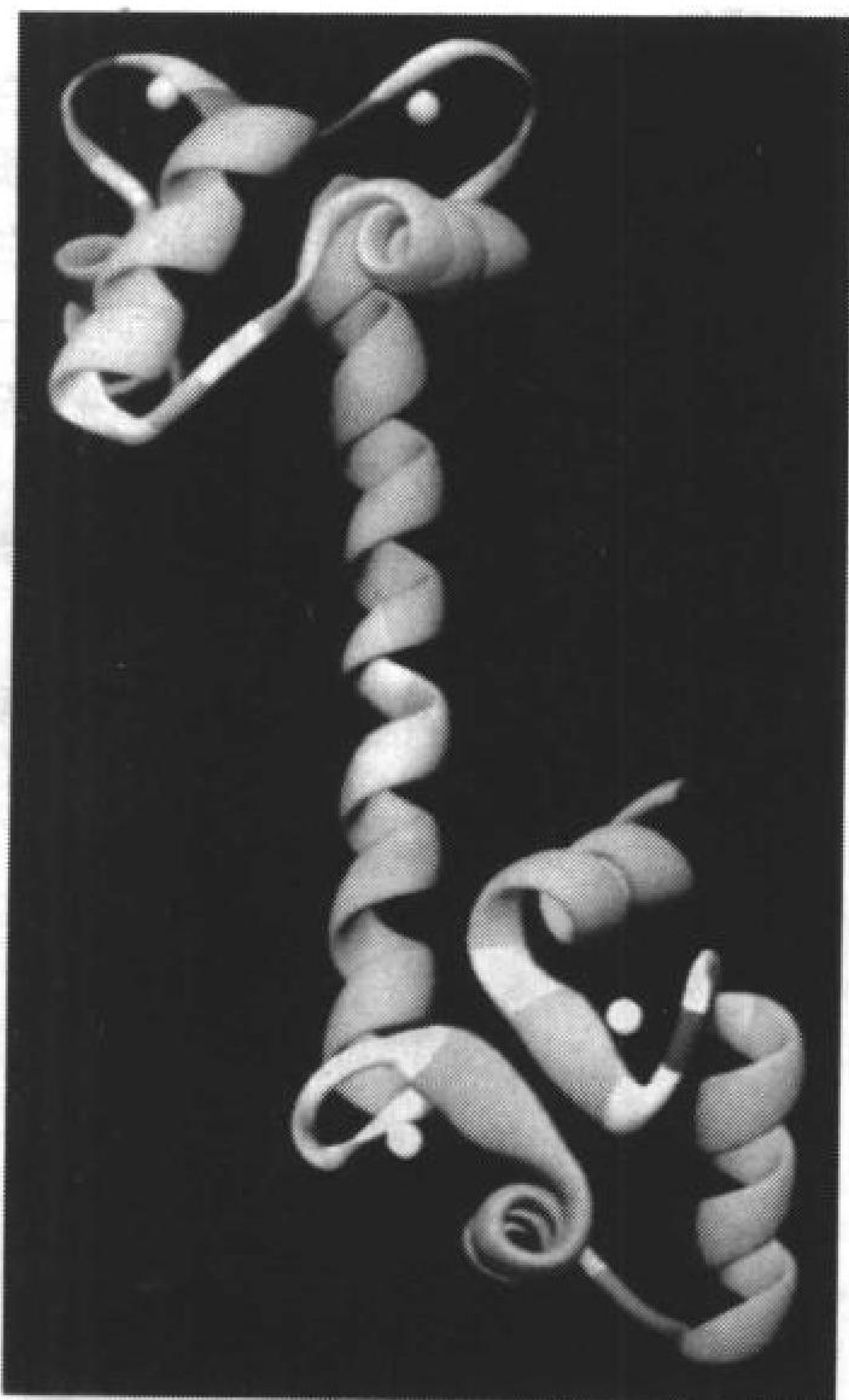


图 15-16　鼠睾丸钙调蛋白的 X 射线结构
一个 7 圈的 α 螺旋明显地分开两个类似球状的结构域，残基按照它们的骨架构象角(ϕ 和 φ；图 6-6)着色：青绿色，α 螺旋；绿色，β 片层；黄色，螺旋和片层之间；紫红色，左手螺旋。Gly 残基为白色而 N 末端是黄色。与每个结构域结合的两个 Ca^{2+} 用白球代表。CaM 的 NMR 研究表明溶液中该中心螺旋的中间部分实际上是非螺旋的。(引自 Mixe Carson, University of Alabama at Birmingham。X 射线结构由 Charles Bugg 测定，University of Alabama at Birnningham)

445

Ca^{2+} 与 CaM 任何一个结构域的结合诱导该结构域构象的变化；它暴露一个以其他方法隐藏的富含 Met 的疏水区段。该区段依次与磷酸化酶激酶 γ 亚基的 CaM 结合结构域(它含有激酶的假底物)以及与许多其他的 Ca^{2+} 调节蛋白质的 CaM 结合结构域高亲和力连接。这些 CaM 结合结构域有很少的相互序列类似，但全是碱性亲水性的 α 螺旋。

尽管未复合的 CaM 有扩张外观(图 15-16)，各种研究指出两个球状结构域与单个靶螺旋结合。这已由 Ca^{2+}-CaM 与靶多肽复合(图 15-18)的 NMR 及 X 射线结构所证实。因此，CaM 的中央 α 螺旋可作为一根柔软的系绳而不是一个刚性的隔离物，其性质可能是扩展序列范围到能够与 CaM 结合。的确，CaM 需要两个 CaM 的球状结构域来活化它的靶：已经被胰蛋白酶水解分离的结构域能与它们的靶肽结合，但不能使酶活化。

磷蛋白磷酸酶-1

许多能磷酸化的酶的活性水平是由对抗磷酸化

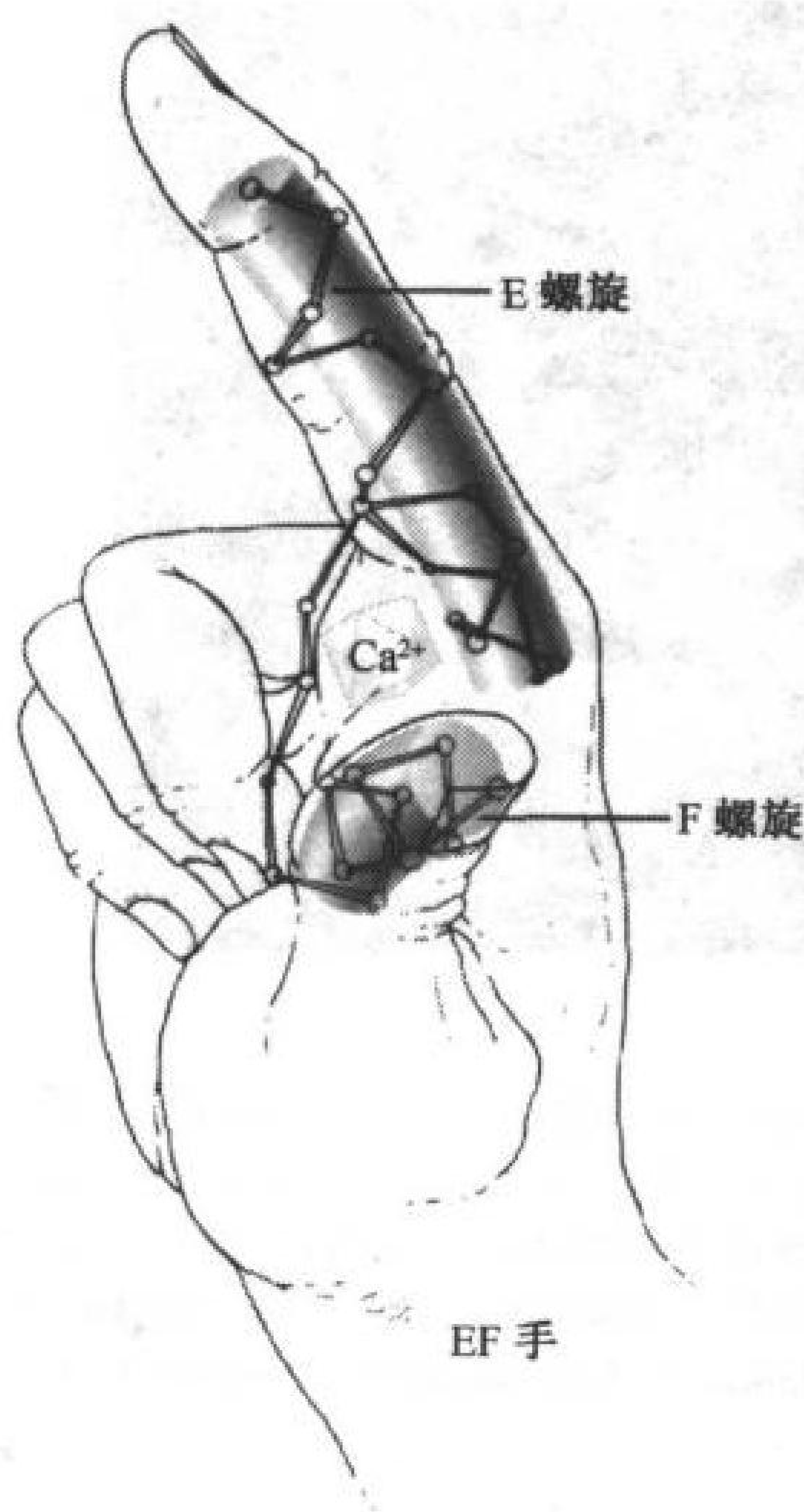


图 15-17 EF 手
在许多对 Ca^{2+} 水平敏感的蛋白中，称为 EF 手的螺旋-环-螺旋形成 Ca^{2+} 结合位点。[引自 Kretsinger, R.H., Annu. Rev. Biochem. 45.241(1976)]

(如被一相应的激酶催化)和水解脱磷酸化(如被磷酸化酶催化)来维持的。磷蛋白磷酸酶-1 从糖原磷酸化酶 a 和磷酸化酶激酶的 α 与 β 亚基(图 15-12)以及糖原代谢中的其他蛋白质(见下)移去磷酸基。

磷蛋白磷酸酶-1 的调控在肌肉和肝中是不同的。肌肉里磷蛋白磷酸酶-1 仅仅当通过它的与糖原结合的 **G 亚基**与糖原结合时才被活化。磷蛋白磷酸酶-1 的活性和它对 G 亚基的亲和力被 G 亚基在两个不同位点的磷酸化调节(图 15-19)。由**胰岛素激活的蛋白激酶**(insulin-stimulated protein kinase, cAPK 和磷酸化酶激酶的 γ 亚基的同系物)磷酸化位点 1 会活化磷蛋白磷酸酶-1，由 cAPK 磷酸化位点 2(它也能磷酸化位点 1)使该酶释放到细胞质中，在那里它不能将糖原代谢中与糖原结合的酶脱磷酸化。

在细胞质中，磷蛋白磷酸酶-1 也由于与蛋白质**磷蛋白磷酸酶抑制剂** 1(抑制剂-1)结合而被抑制。这后一个蛋白质提供了另一例共价修饰调控：它也被 cAPK 活化并被磷蛋白磷酸酶-1 失活(图 15-20，左下)。*因此 cAMP 的浓度调控一个酶的磷酸化型的分数，不仅由于增加它被磷酸化的比率，而且也由于降低它被脱磷酸化的比率。*就糖原磷酸化酶而论，[cAMP]的增加不仅增加该酶的活化比率，而且也降低其失活的比率。

在肝脏中，磷蛋白磷酸酶-1 的活性是由它与磷酸化酶 *a*

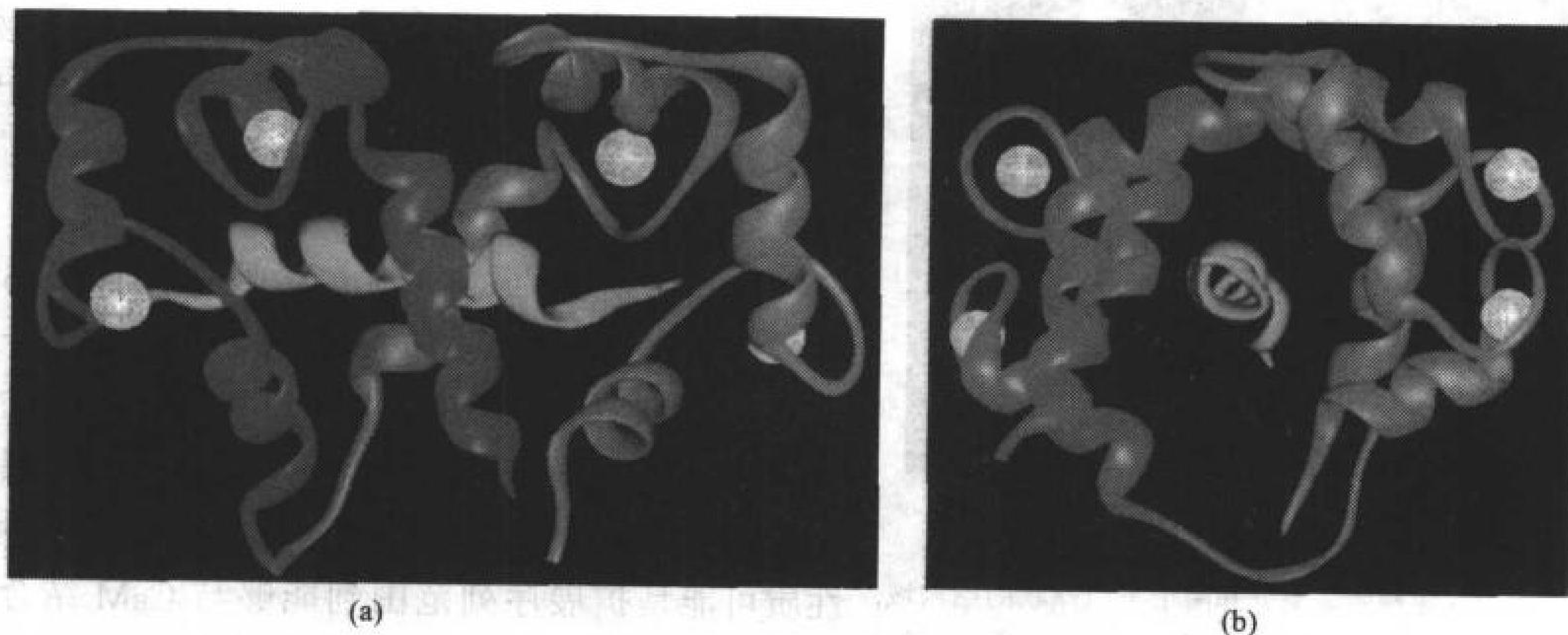


图 15-18 与 26 残基靶多肽结合的钙调蛋白的 NMR 结构
CaM(来自果蝇 *Drosophila melanogaster*)的 N 末端结构域用蓝色表示，它的 C 末端结构域为红色，靶多肽是绿色，而 Ca^{2+} 用青绿色球代表之。(a)该复合物的图，靶多肽的 N 末端在右方。(b)从 a 所表示结构的右边看的侧视图。在这两张图中，与 CaM 的 N 末端和 C 末端结构域有关的假二重对称轴是大致垂直的。注意把两个结构域连在一起的片段是如何解旋而弯曲的(b 中的底部图)以致 CaM 形成一个球状蛋白质，它几乎将螺旋状的靶多肽围绕在一个疏水的隧道之中，就像两手捻住一根绳。(引自 NMR 结构，由 Marius Clore, Argela Gronenborr and Ad Bax 测得，Natimal Instiiutes of Health)

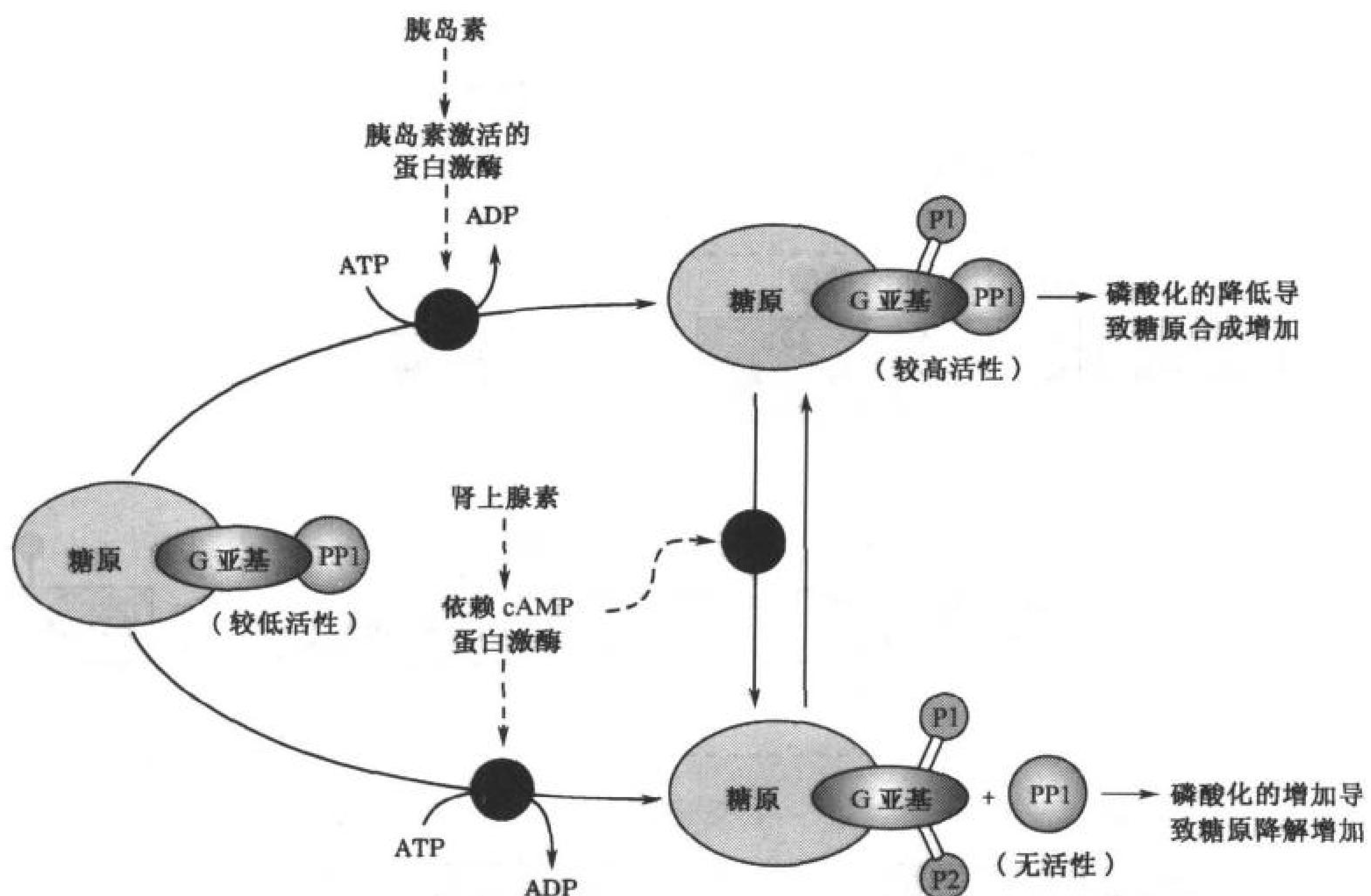


图 15-19　肌肉中磷蛋白磷酸酶-1 的调节

肌肉中胰岛素和肾上腺素对糖原代谢的拮抗效应是通过它们作用于磷蛋白磷酸酶-1(PP1)的结合糖原的 G 亚基发生的。

的结合调控的。磷酸化酶 *a* 的 R 型和 T 型强烈地与磷蛋白磷酸酶-1 结合，但仅仅 T 型状态的 Ser 14 磷酸基易被水解(R 状态 Ser 14磷酸基隐藏在二聚体的界面；图 15-5)。因此，当磷酸化酶 *a* 是活性的 R 型时，它有效地使磷蛋白磷酸酶-1 隐退。然而在磷酸化酶 *a* 转化成 T 状态的条件下，磷蛋白磷酸酶-1 水解现在露出的 Ser 14 磷酰基，因而将磷酸化酶 *a* 转变为磷酸化酶 *b*，它对磷蛋白磷酸酶-1 的亲和力低。因此磷酸化酶 *a* 脱磷酸化作用的一个结果是解除磷蛋白磷酸酶-1 的抑制。因为肝细胞含糖原磷酸化酶 10 倍多于磷蛋白磷酸酶-1，磷酸酶要到约 90% 以上的糖原磷酸化酶是 *b* 型时才会被释放。只有在这个时候磷蛋白磷酸酶-1 才能使它的其他的靶蛋白包括糖原合酶脱磷酸化。　447

葡萄糖是磷酸化酶 *a* 的一个变构抑制剂(图 15-13)。因此，当葡萄糖的浓度高时，磷酸化酶 *a* 转变成 T 型，因而导致它的脱磷酸化以及糖原合酶的脱磷酸化。因此认为在调控肝中糖原代谢方面葡萄糖是重要的。

糖原合酶

磷酸化酶激酶活化糖原磷酸化酶，也磷酸化糖原合酶并因而使之失活。已知 6 个其他的蛋白激酶包括 cAPK，通过与其亚基上 9 个 Ser 残基中的一个或多个磷酸化，至少部分地使人肌肉的糖原合酶失活(图 15-20)。糖原合酶这种精巧调节的原因仍不清楚。

糖原净合成与降解之间的平衡和这些过程的速率依赖于糖原合酶和糖原磷酸化酶的相对活性。在很大程度上这些酶的磷酸化和脱磷酸化的比率调控糖原的合成和分解。这两个过程由 cAPK 和磷酸化酶激酶连接起来，当使糖原合酶失活时，它们通过磷酸化作用活化磷酸化酶(图　448

R_2C_2
cAMP 依赖性
蛋白激酶
（无活性）
cAMP
2C
cAMP 依赖性
蛋白激酶
（有活性）
$+ R_2(cAMP)_4$
磷酸化系统
ATP ADP
$(\alpha\beta\gamma\delta)_4$
磷酸化酶
激酶 *b*
P_i H_2O
$(\alpha\beta\gamma\delta)_4$
磷酸化酶
激酶 *a*
其他激酶
ATP ADP
糖原磷酸
化酶 *b*
P_i H_2O
糖原磷酸
化酶 *a*
糖原合酶 *a*
ATP ADP
P_i H_2O
糖原合酶 *b*
磷酸蛋白磷酸
酶抑制剂 -1*a*
磷酸蛋白磷酸
酶 -1（无活性）
磷酸蛋白磷酸
酶 -1（有活性）
ATP ADP
磷酸蛋白磷酸
酶抑制剂 -1*b*
P_i H_2O
磷酸蛋白磷酸
酶抑制剂 -1*a*
去磷酸化系统

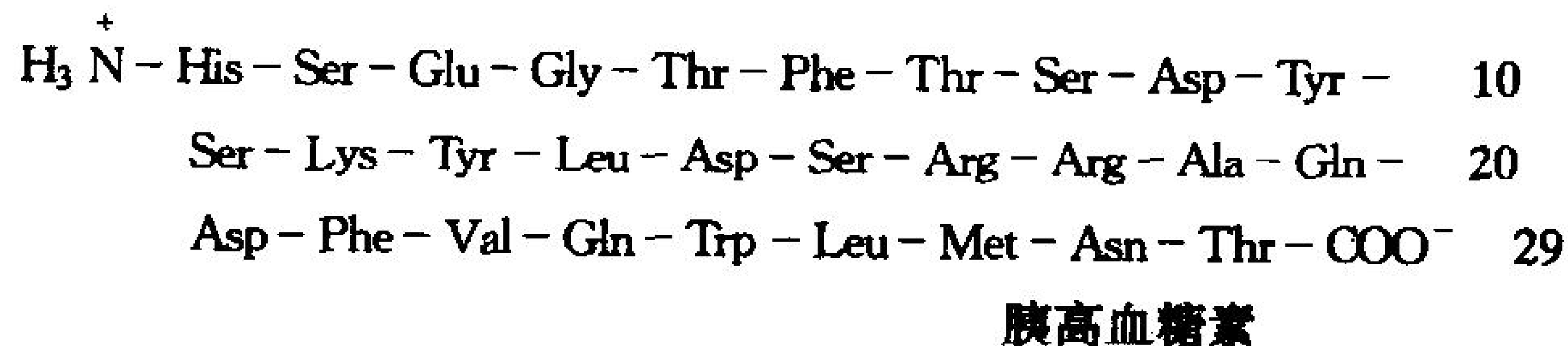
图 15-20 代谢的密诀：肌肉中调节糖原代谢的主要磷酸化和脱磷酸化作用
活性的酶着绿色而失活的酶着粉红色。断续箭头表示促进磷酸化或脱磷酸化反应。

15-20）。它们也由磷蛋白磷酸酶-1 连接在一起，该酶在肝中被磷酸化酶 *a* 抑制，因而不能活化（脱磷酸化）糖原合酶，除非它首先使磷酸化酶 *a* 失活（也可由于脱磷酸化作用）。当然，变构效应物的调控是加在共价修饰的调控之上的，所以像底物 G6P（它活化糖原合酶）的利用也影响到葡萄糖残基结合成糖原的速率。酶的遗传缺陷能破坏糖原代谢的精密调控，导致各种疾病（见框 15-2）。

450

C. 激素对糖原代谢的影响

肝中糖原代谢最终受多肽激素**胰高血糖素**（glucagon）的调控，它像胰岛素一样，由胰腺回应血中葡萄糖浓度而合成。在肌肉和各种组织中，调控是由于胰岛素（epinephrine 或 adrenalin）（图 5-1）和由于肾上腺激素——**肾上腺素**



胰高血糖素

框 15-2　健康与疾病的生物化学

糖原贮积病

糖原贮积病是遗传病，影响糖原代谢，生成数量或质量上不正常的糖原。作为这些疾病基础的遗传缺失的研究有助于阐明糖原代谢的复杂性(例如 McArdle 病)。反过来说，受遗传疾病影响的代谢途径的生化特征常导致该病治疗的有用策略。第 449 页的表列出酶缺失与每类糖原贮积病的联系。

主要影响肝的糖原贮积病通常产生肝大(扩大的肝)和低血糖，然而影响肌肉的糖原贮积病产生肌肉痉挛和虚弱，这两类疾病可能也产生心血管障碍和肾的障碍。

类型 I：葡萄糖-6-磷酸酶缺失(von Gierke 氏病)

葡萄糖-6-磷酸酶催化导致肝释放葡萄糖到血流的最后一步反应。缺失这个酶造成胞内[G6P]的增加，导致肝和肾中糖原的大大积累(回忆 G6P 活化糖原合酶)，并且不能应答胰高血糖素或肾上腺素增加血糖浓度。类型 I 糖原贮积病的症状包括严重的肝大和低血糖，以及身体虚弱。对这类疾病的治疗包括药物诱导抑制肝吸收葡萄糖(以增加血液[葡萄糖])；连续的胃内饱食过夜[再增加血液(葡萄糖)]；手术转位门静脉，因为门静脉通常直接从肠饲食给肝(使富含葡萄糖的血液在到达肝之前到达周边组织)；以及肝移植。

类型 II：α-1，4-葡糖苷酶缺失(Pompe 氏病)

α-1，4-葡糖苷酶缺失是最严重的糖原贮积病，它造成在所有细胞的溶酶体中大量积累正常结构的糖原，并由于心搏呼吸故障致死，常常在一岁以前，α-1，4-葡糖苷酶不包含在糖原代谢的主要途径之中。它存在于溶酶体中，水解麦芽糖(一种葡萄糖的二糖)和其他线性寡糖以及糖原外部的分支，因而产生游离的葡萄糖。通常糖原代谢的这一替代途径在量上是不重要的，其生理意义尚不了解。

类型 III：淀粉-1，6-葡糖苷酶(脱支酶)缺失(Cori 氏病)

Cori 氏病在肝和肌肉中积累含很短外链的异常结构的糖原，因此，不存在脱支酶时，糖原不能进一步降解。所造成的低血糖不如 von Gierke 氏病(类型 I)严重，并能用频繁进食和高蛋白饮食(补偿由于葡糖异生作用造成的氨基酸损失)治疗。由于未知的原因，Cori 氏病的症状常在青春期消失。

类型 IV：淀粉-(1，4→1，6)转糖基酶(分支酶)缺失(Andersen 氏病)

Andersen 氏病是最严重的糖原贮积病之一，由于肝的机能障碍，患者四岁以后很少存活。肝的糖原浓度是正常的，但它含有不分支的长链，大大降低了它的溶解度。肝机能障碍可能由一个对异常糖原的“异体”免疫反应引起。

类型 V：肌肉磷酸化酶缺失(McArdle 氏病)

McArdle 氏病的症状，肌肉用力时痛苦地痉挛，典型情况是到成年早期才会出现，并能通过避免剧烈运动来预防。这一条件影响肌肉中但不影响肝中糖原的代谢，肝含有正常量的不同的磷酸化酶同工酶。

类型 VI：肝磷酸化酶缺失(Hers 氏病)

患肝磷酸化酶缺失的病人的症状与类型 I 糖原贮积病的患者相似。在这种情况下低血糖是由于肝糖原磷酸化酶不能应答循环葡萄糖的需求造成的。

类型 VII:肌肉磷酸果糖激酶缺失(Tarui 氏病)

肌肉中缺失糖酵解酶 PFK 的结果是不正常地增加糖酵解的代谢物 G6P 和 F6P。高浓度 G6P 增加糖原合酶和 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶的活性(G6P 与 G1P 处于平衡中,是 UDP-葡萄糖焦磷酸化酶的一个底物),所以糖原在肌肉中积累。其他的症状与肌肉磷酸化酶缺失的类似,因为 PFK 缺失使糖酵解不能维持肌肉收缩对 ATP 的需求。

类型 VIII:X-连锁的磷酸化酶激酶缺失

一些有类型 VI 糖原贮积病症状的个人有正常的磷酸化酶,但磷酸化酶激酶缺失,造成不能将磷酸化酶 b 转化成磷酸化酶 a。磷酸化酶激酶的 α-亚基是由 X 染色体上的一个基因编码的,所以类型 VIII 病是 X-连锁的,而不是常染色体隐性的,其他的糖原贮积病则是常染色体隐性的。

类型 IX:磷酸化酶激酶缺失

磷酸化酶激酶缺失,一种常染色体隐性的疾病,是由于编码磷酸化酶激酶 β、γ 和 δ 亚基的基因之一发生变异造成的。因为不同的组织含有不同的磷酸化酶激酶同工酶,故该病的症状和严重性随受影响的器官而改变。因此对于诊断特殊的糖原贮积病,识别遗传病变的技术比临床症状更可依赖。

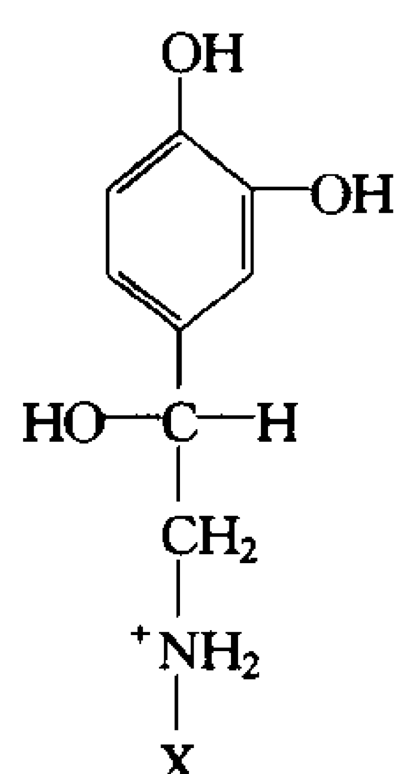
类型 X:肝糖原合酶缺失

肝糖原合酶缺失是糖原代谢疾病中仅有的糖原缺失而非糖原过剩,患类型 X 疾病的个人肝糖原合酶的活性特别低,餐后血糖过高而其他时间则低血糖。然而有些个人是无症状的,这暗示可能有多种形式的这种常染色体隐性疾病。

遗传性糖原贮积病

类型	酶缺失	组织	普通名称	糖原结构
I	葡萄糖-6-磷酸酶	肝	von Gierke 氏病	正常
II	α-1,4-葡糖苷酶	所有溶酶体	Pompe 氏病	正常
III	淀粉-1,6-葡糖苷酶	所有器官	Cori 氏病	外面的链不足或很短
IV	淀粉-(1,4→1,6)-转糖基酶(分支酶)	肝,可能所有器官	Andersen 氏病	很长的未分支链
V	糖原磷酸化酶	肌肉	McArdlle 氏病	正常
VI	糖原磷酸化酶	肝	Hers 氏病	正常
VII	磷酸果糖激酶	肌肉	Tarui 氏病	正常
VIII	磷酸化酶激酶	肝	X-连锁的磷酸化酶激酶缺失	正常
IX	磷酸化酶激酶	所有器官		正常
X	糖原合酶	肝		正常,量不足

及**去甲肾上腺素**(norepinephrine 或 noradrenalin)的作用。这些激素在它们的靶组织中影响代谢是由于最大限度地刺激调节酶的共价修饰(磷酸化作用)。它们这样做时与细胞表面上的横跨膜的**受体**(receptor)相结合。不同的细胞类型有不同的受体,因而对不同激素组作出应答。这种应答导致细胞内总称为**第二信使**(second messenger)的分子释放,也就是外表面上接受激素信息的胞内的介体。不同的受体释放不同的



X = CH_3　肾上腺素

X = H　去甲肾上腺素

第二信使。在 19 世纪 50 年代由 Earl Sutherland 鉴定的 cAMP 是已发现的第一个第二信使。Ca^{2+} 当从胞内库释放到胞液时,也是一个普通的第二信使。受体和第二信使将在节 21-3 作更深入的讨论。

当激素的刺激增加胞内的 cAMP 浓度时,cAPK 活性增加,增加了许多蛋白质磷酸化的速率,并降低了它们脱磷酸化的速率。由于画于图 15-20 中的调节体系的级联性质,[cAMP]的小变化造成磷酸化的酶的部分很大的变化。当大部分糖原代谢酶磷酸化时,代谢通量朝向糖原分解的方向,因为糖原磷酸化酶是活性的而糖原合酶是失活的。当[cAMP]降低时,磷酸化速率降低,脱磷酸化速率增加,脱磷酸化型的酶的部分增加,造成的糖原合酶的活化和糖原磷酸化酶的抑制使通量移向净糖原合成。

胰高血糖素在肝细胞中与它的受体结合,产生胞内的 cAMP,导致储备的糖原中葡萄糖的流动(图 15-21)。当循环的葡萄糖浓度降低到小于约 $5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,例如运动或饭后已消化数小时时,从胰腺中释放胰高血糖素。因此,胰高血糖素对于肝供应葡萄糖给各组织(主要依赖糖酵解满足能量需要)的功能是关键的。肌肉细胞对胰高血糖素无反应,因为它们缺乏适当的受体。　451

肾上腺素和去甲肾上腺素,它们常被称作"搏斗或逃跑"激素,由肾上腺在回应紧张时释放到血流中。这些激素有两类受体:**β-肾上腺素能受体**(β-adrenergic receptor),它与腺苷酸环化酶体系连接;**α-肾上腺素能受体**(α-adrenergic receptor),它的第二信使使细胞内的[Ca^{2+}]增加(节 21-3B)。肌肉细胞有 β-肾上腺素能受体(图 15-21),通过分解糖原用作糖酵解对肾上腺素作出反应,因而生成 ATP 并帮助肌肉对抗触发肾上腺素释放的紧张。

肝细胞直接地和间接地对肾上腺素作出反应。肾上腺素促进从胰腺释放胰高血糖素,而胰高血糖素在肝细胞中与其受体结合刺激糖原分解,如上所述。肾上腺素也直接与肝细胞表面的 α-及 β-肾上腺素能受体结合(图 15-21)。与 β-肾上腺素能受体结合导致细胞内 cAMP 的增加而引起糖原分解。肾上腺素与 α-肾上腺素能受体结合刺激细胞内[Ca^{2+}]的增加,增强细胞对 cAMP 的回应(回忆磷酸化酶激酶,它活化糖原磷酸化酶并使糖原合酶失活,仅在被磷酸化和增加[Ca^{2+}]的情况下才是完全活性的)。此外,糖原合酶通过被数种 Ca^{2+} 依赖的蛋白激酶催化的磷酸化作用而失活。　452

胰岛素和肾上腺素是拮抗物

胰腺回应高水平流动的葡萄糖(例如餐后即刻)释放胰岛素。胰岛素的激素刺激增加了葡萄糖运送到许多类型细胞的速率,这些细胞在其表面有胰岛素受体(例如肌肉和脂肪细胞,而非肝和脑细胞)。此外,[cAMP]降低使糖原代谢从糖原分解移向糖原合成(图 15-21)。对于胰岛素

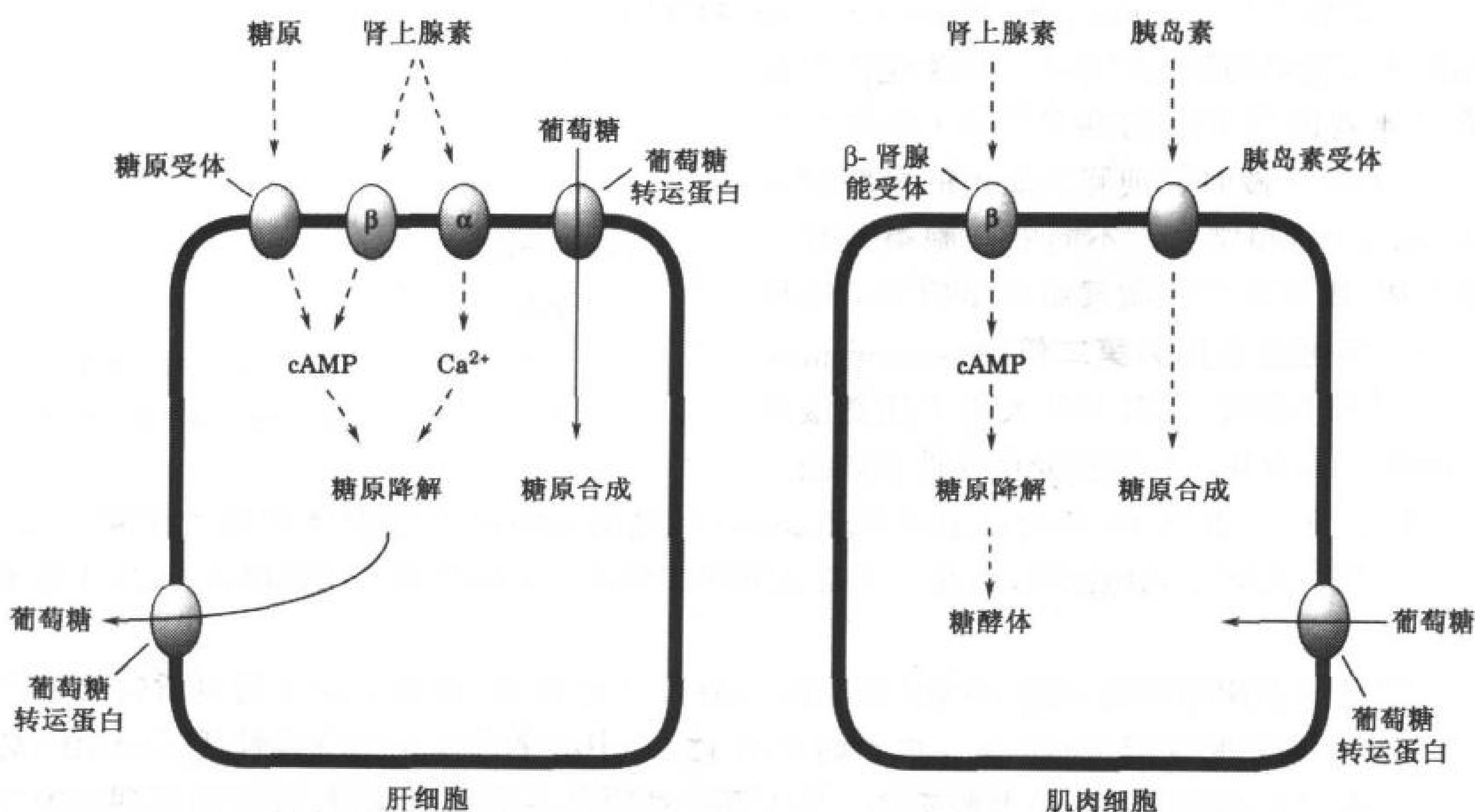


图 15-21 糖原代谢的激素调控

肾上腺素与肝和肌肉细胞的β-肾上腺素能受体结合增加细胞内的[cAMP],促进糖原降解为 G6P 用作糖酵解(肌肉中)或降解为葡萄糖用作输出(在肝中)。肝类似地对胰高血糖素作出回应。肾上腺素与肝细胞α-肾上腺素能受体结合导致增加胞液的[Ca^{2+}],也促进糖原降解。当循环的葡萄糖丰富时,胰岛素刺激肌肉细胞中糖原的合成,肝通过增加糖原合成直接回应葡萄糖的增加。

作用的机制仅仅部分地了解,但其靶酶之一好像是磷蛋白磷酸酶-1。

如图 15-19 约略所示,在肌肉中胰岛素活化胰岛素刺激的蛋白质激酶,使磷蛋白磷酸酶-1 的糖原结合 G 亚基的位点 1 被磷酸化,从而活化该蛋白质,并因此使糖原代谢的酶脱磷酸化。以糖原方式储备葡萄糖就是通过抑制糖原分解和刺激糖原合成得以促进。

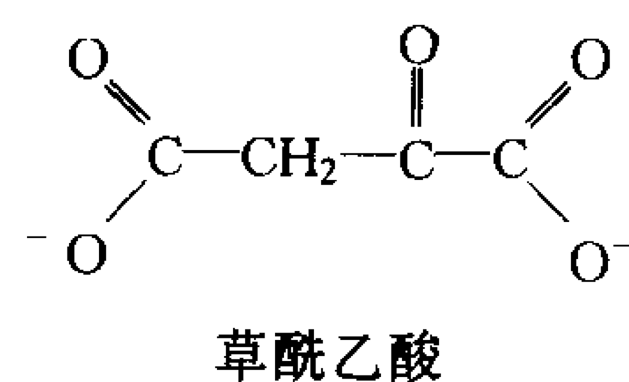
在肝中葡萄糖本身而非胰岛素被认为可能是回应糖原代谢体系的信使。*葡萄糖抑制磷酸化酶 a 是通过与该酶失活的 T 状态相结合,因而将 T $\rightleftharpoons$ R 平衡移向 T 状态*(图 15-13)。这种构象的变化使 Ser 14 磷酰基遭受脱磷酸化。因此葡萄糖浓度的增加通过将糖原磷酸化酶 a 转变成磷酸化酶 b 来促使磷酸化酶 a 的失活。所以当葡萄糖丰富时,肝能以糖原形式贮存过量的葡萄糖。

4. 糖异生作用

当饮食的葡萄糖来源不足,并且肝已消耗掉糖原的供应时,就从非碳水化合物前体通过糖异生作用合成葡萄糖。事实上,糖异生作用给断食者提供相当部分的葡萄糖,甚至在进食后数小时之内。糖异生作用发生在肝中,也有少量在肾中。

*能转化成葡萄糖的非碳水化合物前体包括糖酵解产物乳酸和丙酮酸,柠檬酸循环中间物,以及大多数氨基酸的碳架。*然而,首先是所有这些物质必须转化成四碳化合物**草酰乙酸**(oxaloacetate),草酰乙酸本身是柠檬酸循环的一个中间物(节 16-1)。动物中不能转化成草酰乙酸的氨基

酸只有亮氨酸和赖氨酸，因为它们的分解只产生乙酰 CoA（节 20-4E），而且因为动物中没有乙酰 CoA 净转化成草酰乙酸的途径。同样动物不能以脂肪酸作为葡萄糖前体，因为大多数脂肪酸完全地降解成乙酰 CoA（节 19-2）。



为方便起见，我们认为糖异生作用是丙酮酸转化成葡萄糖的途径。糖异生作用的大多数反应是逆向进行的糖酵解反应（图 15-22）。然而糖酵解的酶已糖激酶、磷酸果糖激酶以及丙酮酸激酶催化的反应有很大的负自由能变化，因此这些反应在糖异生中必须被那些使葡萄糖合成在热力学上有利的反应取代。

453

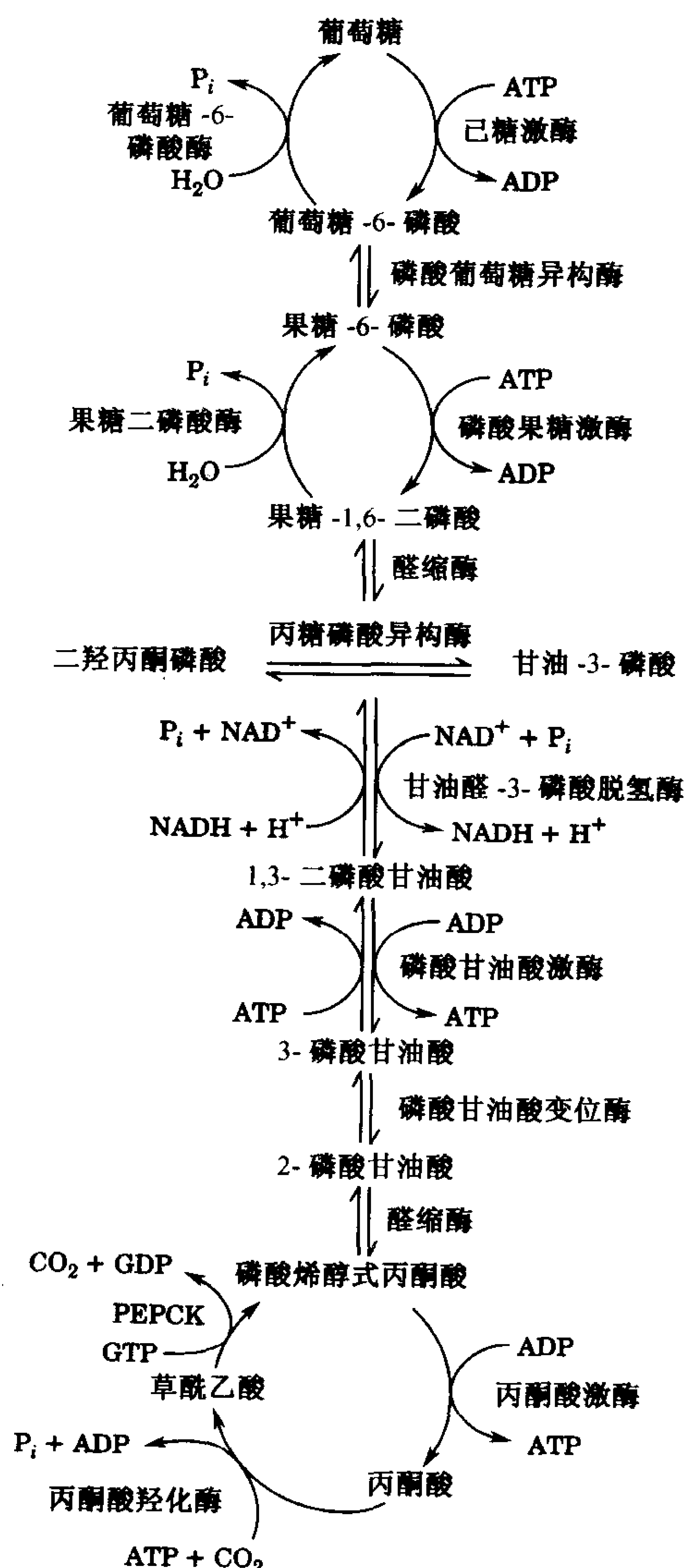


图 15-22　代谢的秘诀：糖异生和糖酵解途径的比较
红色箭头代表糖异生作用中不同的酶催化的步骤。糖异生作用的其他 7 个反应步骤是被糖酵解的酶催化的，其功能近于平衡。

A. 丙酮酸到磷酸烯醇式丙酮酸

我们开始考察糖异生作用独特的丙酮酸转化为磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)的反应。因为这一步和丙酮酸激酶催化的高度放能反应相反(节 14-2J),故要求自由能输入,它的实现首先是转化丙酮酸为草酰乙酸。草酰乙酸是一个“高能”中间物,因为它的放能脱羧作用提供 PEP 合成所需的自由能。该过程要求两个酶(图 15-23):

454

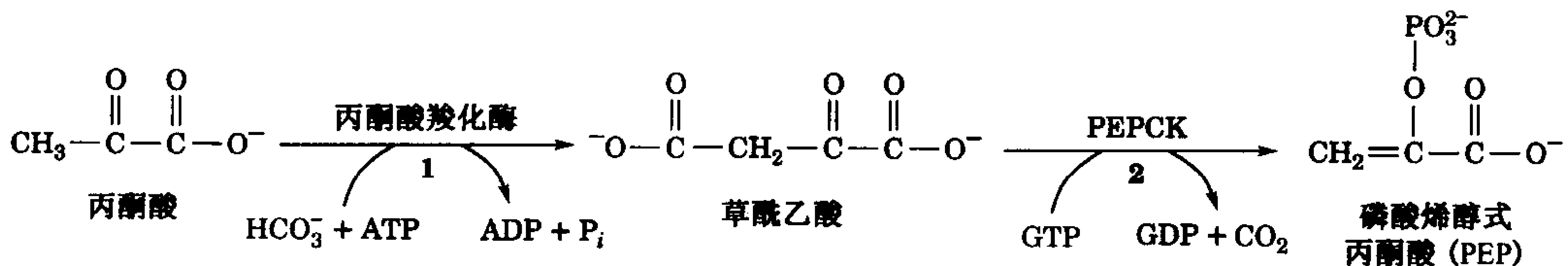


图 15-23 丙酮酸转化成磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)

这个过程要求(1)丙酮酸羧化酶将丙酮酸转化成草酰乙酸和(2)PEP 羧激酶(PEPCK)将草酰乙酸转化成 PEP。

1) **丙酮酸羧化酶**(pyruvate carboxylase)催化 ATP 驱动的从丙酮酸和 HCO_3^- 形成草酰乙酸。
2) **PEP 羧激酶(PEPCK)**将草酰乙酸转化成 PEP,该反应使用 GTP 作为磷酰基供体。

丙酮酸羧化酶有一个生物素辅基

丙酮酸羧化酶是相同的约 120kDa 亚基的四聚体蛋白质,每个亚基有一个**生物素**(biotin)辅基。生物素(图 15-24a)的功能是作为 CO_2 载体,在其**脲基**(ureido group)上形成一个羧基的取代基(图 15-24b)。生物素与酶的 Lys 残基共价结合形成**生物胞素**[biocytin,也称**生物素基赖氨酸**(biotinyllysine)]残基(图 15-24b)。因此,生物素环系统是在 14Å 长柔性臂的末端。生物素于 1935 年首先被证明为酵母菌的生长因子,是人的一种基本营养物质。然而对它的营养缺乏是少有的,因为生物素存在于许多食物中,并被肠细菌合成。

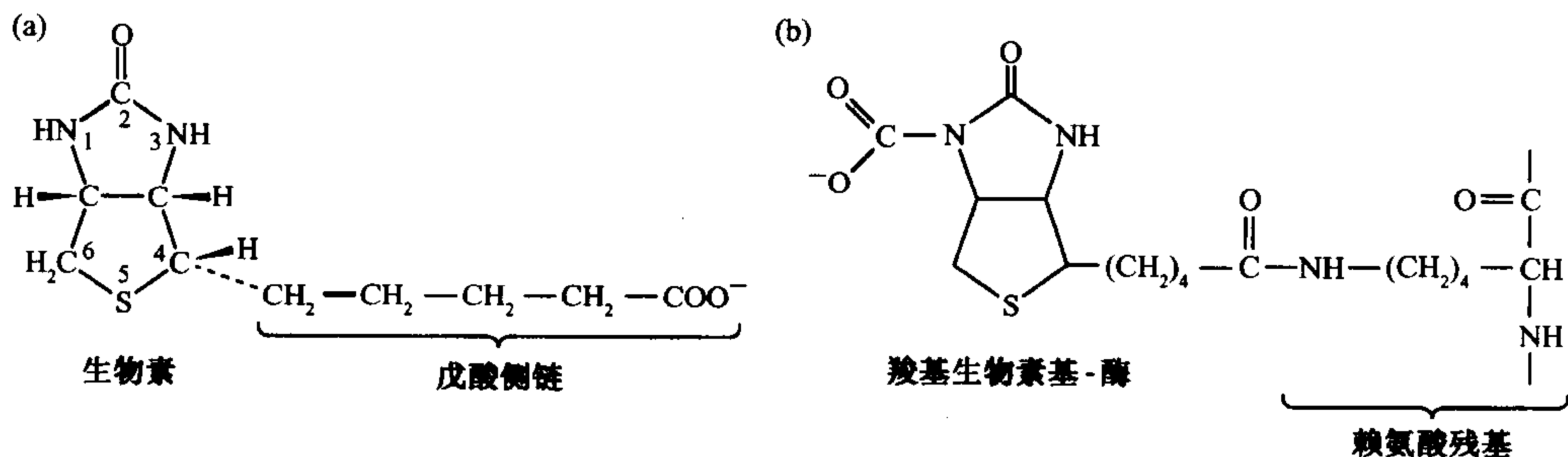


图 15-24 生物素和羧基生物素基-酶

(a)生物素由一个咪唑环与一个四氢噻吩环顺式融合所组成,并带有一个戊酸侧链。位置 1,2 和 3 构成一个脲基。(b)生物素与羧化酶的共价连接是通过它的戊酸基与酶的 Lys 支链的 ε-氨基之间的酰胺键。当生物素脲基的 N1 被羧化时形成羧基生物素基-酶。

丙酮酸羧化酶反应有两个阶段(图 15-25):

阶段 I　ATP 与脱水碳酸氢盐作用分解成 ADP,形成一个"高能"羧基磷酸中间物。产生的 CO_2 有足够的自由能去羧化生物素。因此这个与生物素结合的羧基相对于碳酸氢盐是"活化的",并能被转移给另一分子,而无需进一步输入自由能。

阶段 II　活化的羧基在一个三步的反应中从羧基生物素转移给丙酮酸生成草酰乙酸。

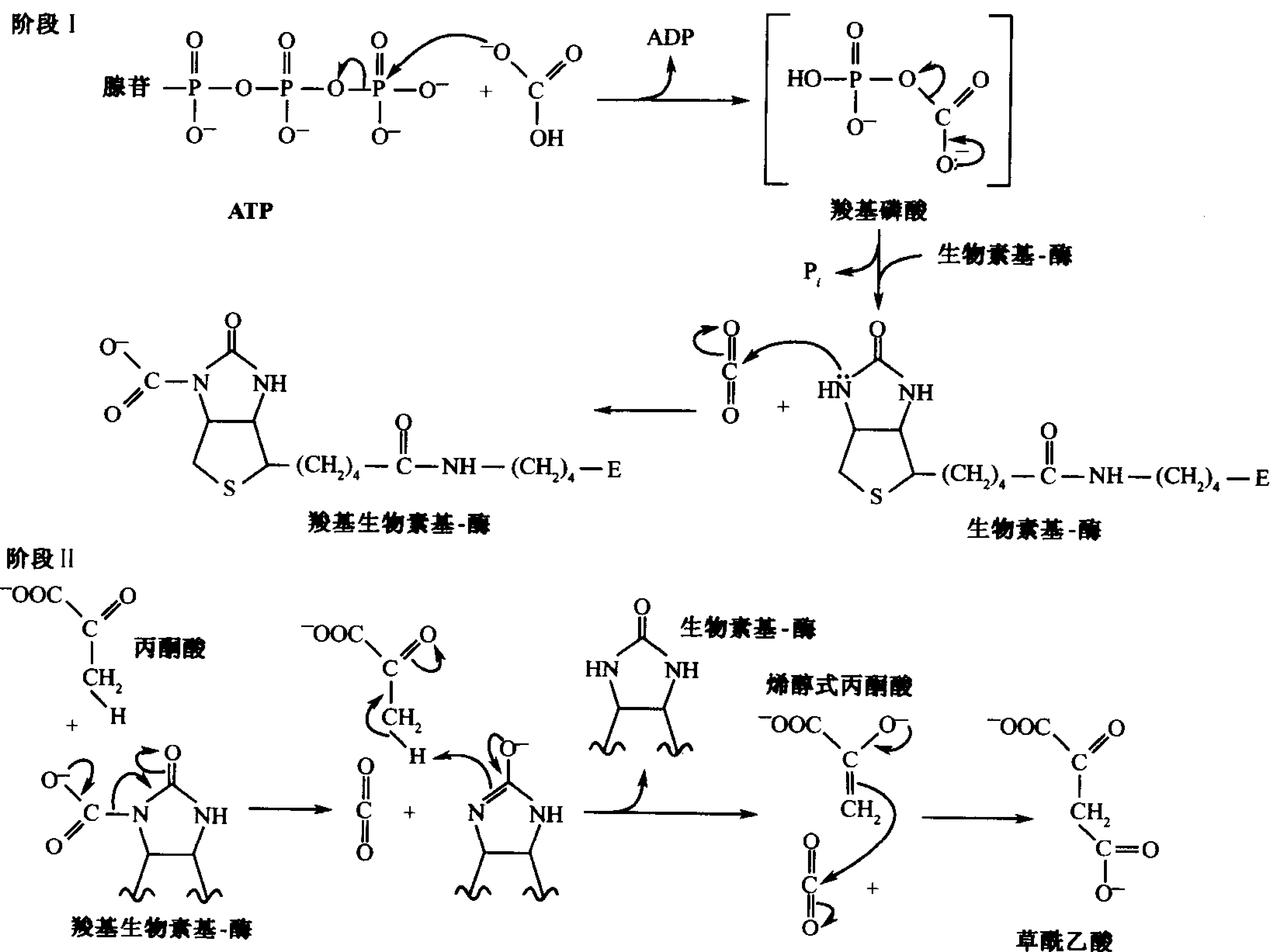


图 15-25　丙酮酸羧化酶的两阶段反应机制

阶段 I 是三步反应,其中从碳酸氢盐和 ATP 形成羧基磷酸,随后产生 CO_2,再羧化生物素。阶段 II 是三步反应,其中在活性位点产生 CO_2 是通过除去生物素基-酶,它从丙酮酸接受一个质子,并产生烯醇式丙酮酸。然后烯醇式丙酮酸亲核攻击 CO_2 产生草酰乙酸。[引自 Knowles, J.R., Annu. Rev. Biochem. 58217(1989)]

这两个反应阶段发生在同一个酶的不同亚基上;生物胞素 14Å 长的柔性臂在两个位点之间转移生物素环。

草酰乙酸是葡糖异生作用的一个前体,也是柠檬酸循环的一个中间物(节 16-3)。当柠檬酸循环底物乙酰 CoA 积累时,它变构地活化丙酮酸羧化酶,因而增加能参与柠檬酸循环的草酰乙酸的量。当柠檬酸循环活性低时,草酰乙酸则进入糖异生的途径。

PEP 羧激酶

456

PEPCK 是一个单聚体的 74kDa 的酶,催化 GTP 驱动的草酰乙酸脱羧反应形成 PEP 和 GDP (图 15-26)。注意羧化丙酮酸产生草酰乙酸的 CO_2 在形成 PEP 时被消除掉。因此草酰乙酸能被看作是"活化的"丙酮酸,而 CO_2 和生物素以 ATP 为代价促进这种活化。

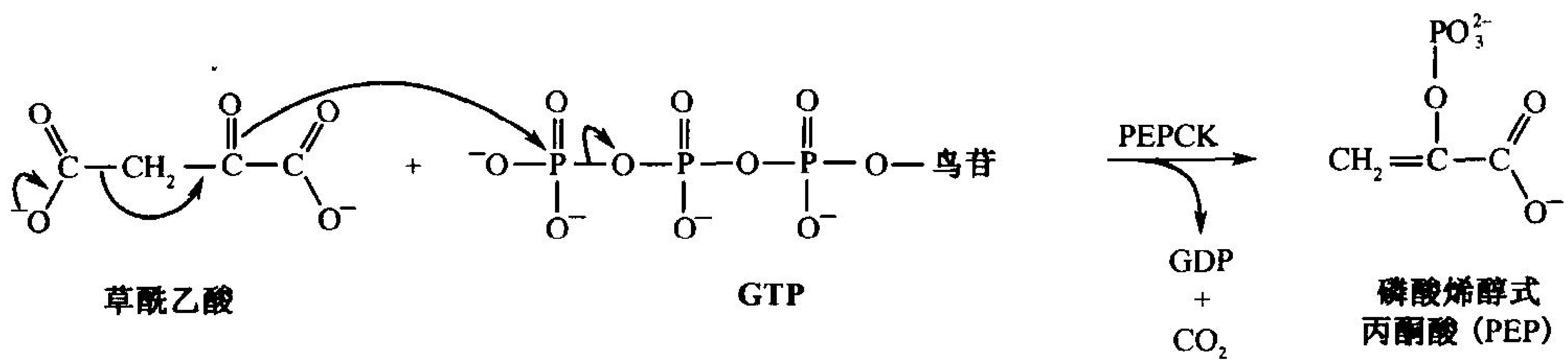


图 15-26 PEPCK 机制

草酰乙酸(β-酮酸)脱羧形成一个共振稳定的烯醇式阴离子,它的氧原子攻击 GTP 和 γ-磷酰基,形成 PEP 和 GDP。

糖异生作用要求代谢物在线粒体与胞液之间运输

从丙酮酸或柠檬酸循环中间物生成草酰乙酸只发生在线粒体中,然而将 PEP 转化成葡萄糖的酶是在胞液中。PEPCK 在细胞中的位置是改变的:在有些种,它是在线粒体中;在另一些种它是在胞液中;还有一些种(包括人)中它相等地分布在这两个区域。要使葡糖异生作用发生,或者草酰乙酸必须离开线粒体转化成 PEP,或者在那里形成的 PEP 必须进入胞液。

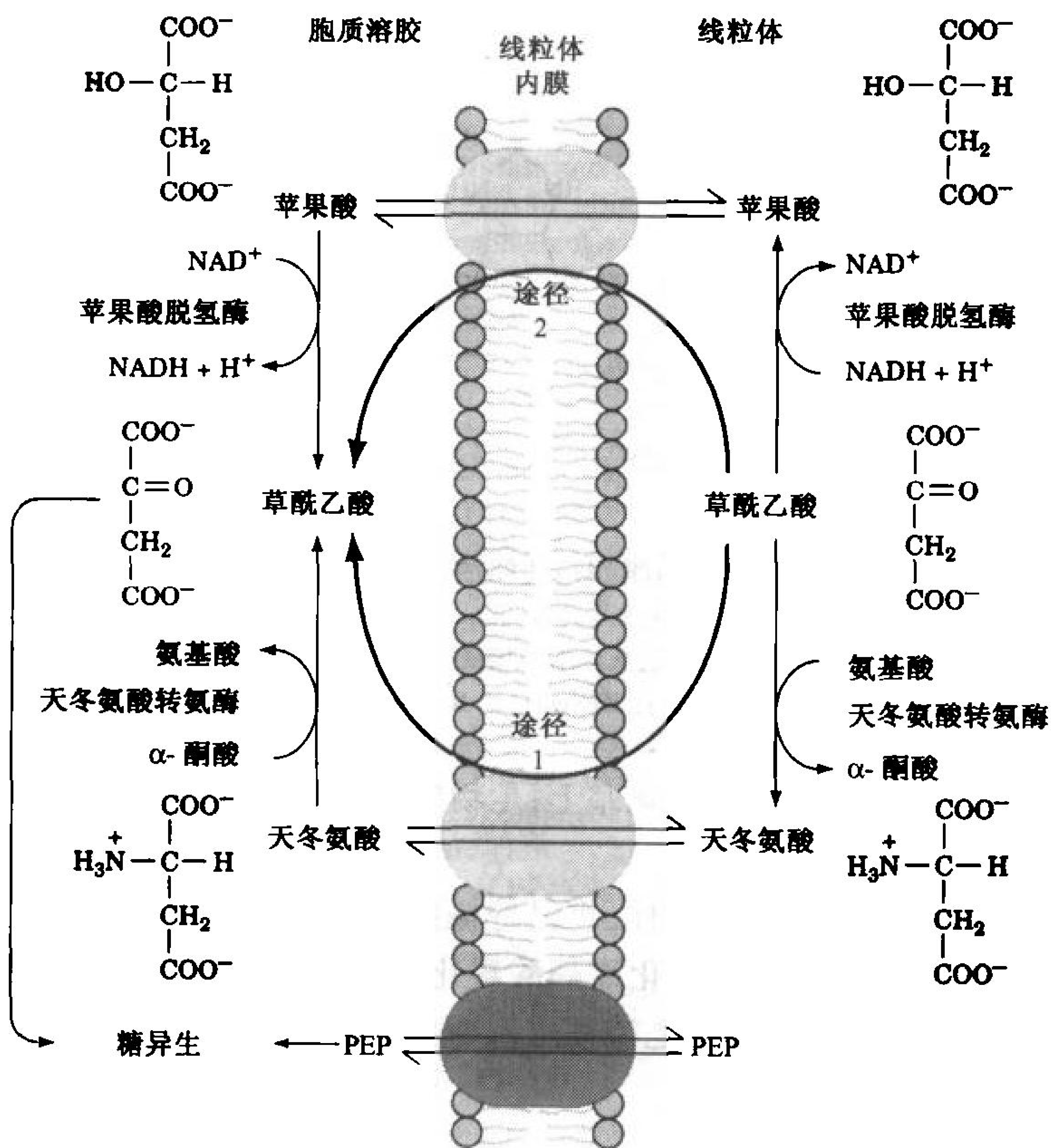


图 15-27 从线粒体运输 PEP 和草酰乙酸到胞液中

PEP 直接在这两个区域间运输。然而草酰乙酸必须首先转化成天冬氨酸,通过天冬氨酸转氨酶的作用(途径 1)或者由苹果酸脱氢酶转化成苹果酸(途径 2)。途径 2 包含线粒体氧化 NADH 随之以胞液还原 NAD^+,因而也从线粒体转运 NADH 还原当量到胞液。

PEP 由专一的膜运输蛋白使其穿过线粒体膜。然而对于草酰乙酸却没有这样的运输系统。对具有胞液的 PEPCK 的种而言，草酰乙酸必须首先转化成天冬氨酸（图 15-27，途径 1）或者**苹果酸**（malate）（图 15-27，途径 2），因为线粒体中有它们的运输系统。这两条途径之间的不同在于运输 NADH **还原当量**（reducing eqivalents）（在运输还原当量时，电子——而不是电子载体——穿过膜）。**苹果酸脱氢酶**（malate dehydrogenase）途径（途径 2）是还原当量从线粒体运输到胞液，因为它使用线粒体的 NADH 并产生胞液的 NADH。**天冬氨酸转氨酶**（aspartate aminotransferase）途径（途径 1）不包含 NADH。胞液的 NADH 是糖异生作用所必需的，所以在大多数条件下通过苹果酸的途径是必需的。然而，倘若糖异生作用的前体是乳酸，它氧化成丙酮酸时产生胞液的 NADH，于是任何一个运输系统都能使用。图 15-27 表示的所有反应是自由可逆的，所以在适当条件下，苹果酸-天冬氨酸穿梭系统也参与运输 NADH 还原当量到线粒体中，以便电子传递和氧化磷酸化（节 17-1B）。

B. 水解反应

从 PEP 到果糖-1，6-二磷酸（FBP）的途径是由糖酵解的酶可逆地催化的。然而由磷酸果糖激酶（PFK）和己糖激酶催化的糖酵解反应在葡糖异生中的方向是吸能的，因此必须被不同的葡糖异生的酶旁路。FBP 被果糖-1，6-二磷酸酶（FBP 酶）水解，生成的果糖-6-磷酸（F6P）异构化成 G6P，再被葡萄糖-6-磷酸酶水解，这同一个酶将糖原衍生的 G6P 转化成葡萄糖（节 15-1C），且它仅存在于肝和肾中。注意这两个水解反应释放 P_i，而不是 ATP→ADP 的逆向反应，后者在这一点上存在于糖酵解途径中。

457

由糖异生作用转化两个丙酮酸分子成一个葡萄糖分子的净能损失是 6 个 ATP 当量：在被丙酮酸羧化酶、PEPCK 以及磷酸甘油酸激酶催化的每一步都是 2 个当量。因为通过糖酵解转化一个葡萄糖分子成两个丙酮酸分子的能量收益是 2 个 ATP（节 14-1），葡萄糖转化成丙酮酸然后重新被合成的无效循环的能量损失是 4 个 ATP 当量。这种自由能的丢失是必须支付的热力学代价，以维持独立地调节两条正相反的途径。

458

虽然葡萄糖被认为葡糖异生途径的终点，但途径的中间物也可能指向别处，例如通过磷酸戊糖途径（节 14-6）的转酮酶和转醛酶反应产生核糖-5-磷酸。由葡糖异生作用产生的 G6P 可能不水解成葡萄糖而代之转化成 G1P 以结合到糖原中。

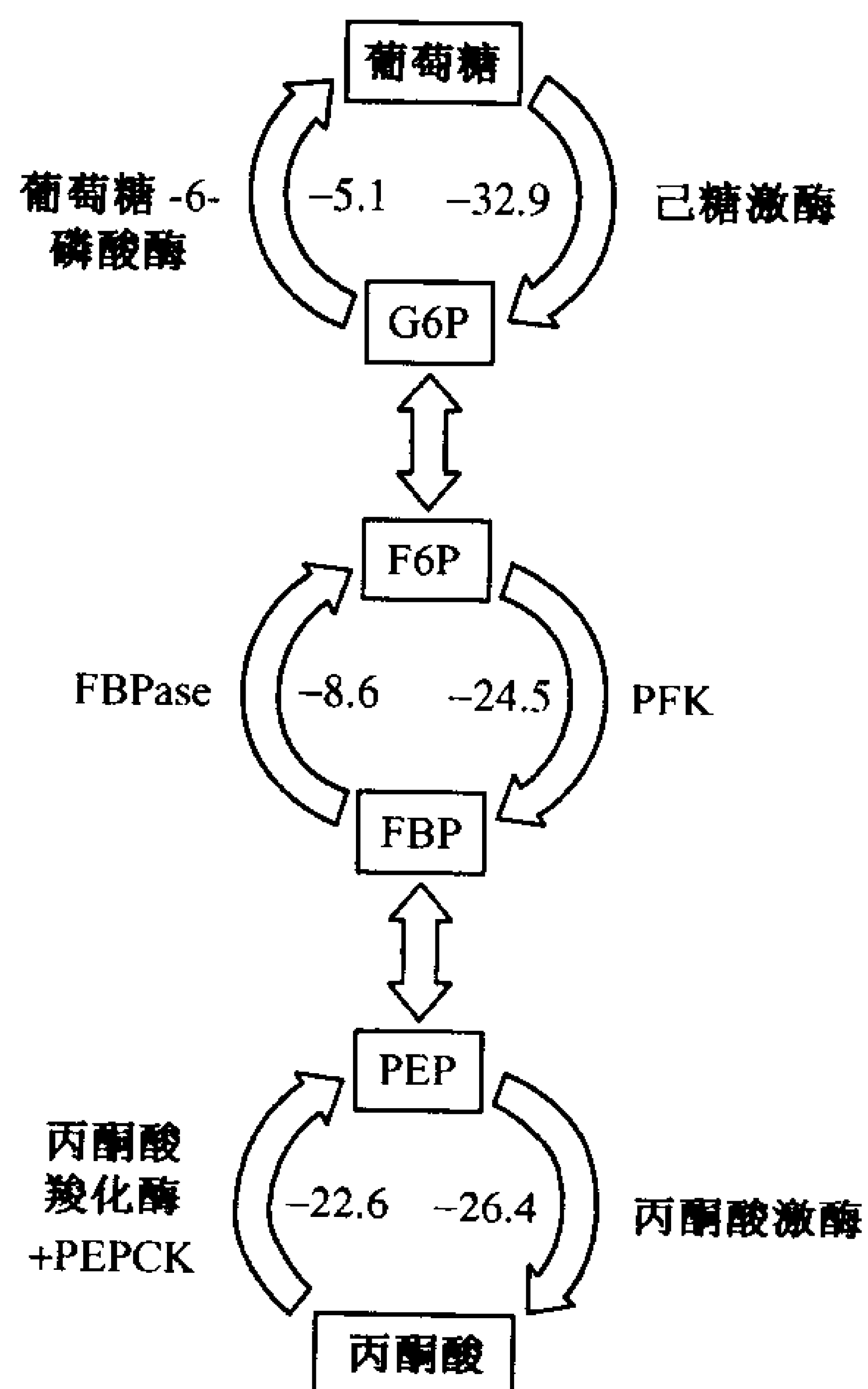


图 15-28　葡萄糖代谢中的底物循环

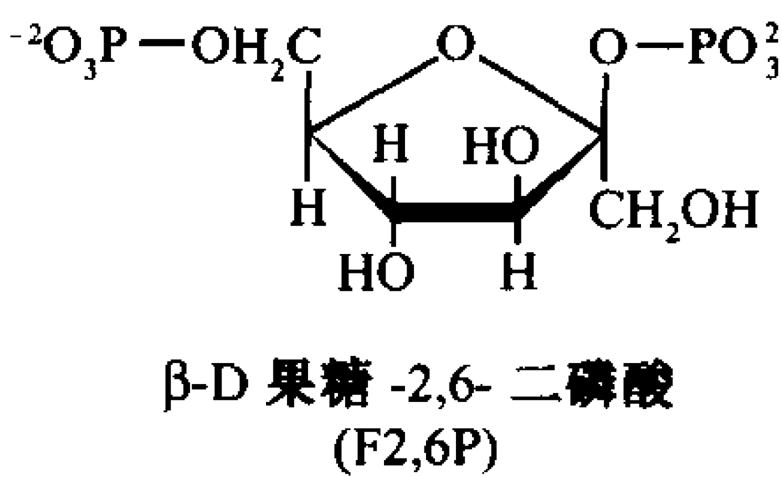
葡萄糖与 G6P，F6P 与 FBP 以及 PEP 与丙酮酸的正向和逆向的相互转化被不同的酶催化，所以所有的反应是放能的（肝中这些反应的 ΔG 值以 $kJ \cdot mol^{-1}$ 表示）。［引自 Newsholme，EA cond Leech，A. R.，Biochemistry for the Medical Sciences，p448，wiley（1983）］

C. 糖异生作用的调节

葡糖异生和糖酵解的正相反的途径，有如糖原合成和降解，在活体中不能自发地进行，代替的是这些途径被相互调节以适应生物之需。调节糖酵解对葡糖异生的通量有三个底物循环，因而有三个可能存在的点

(图 15-28)。

果糖-2,6-二磷酸活化磷酸果糖激酶并抑制果糖-1,6-二磷酸



通过由 PFK 和 FBP 酶的相反作用造成的底物循环的通量(在节 14-4B 叙述)由果糖-2,6-二磷酸(F2,6P)的浓度决定:F2,6P 不是糖酵解的中间物,而是一个极有力的 PFK 的变构活化剂和 FBP 酶的一个抑制剂。

细胞中 F2,6P 的浓度依赖于分别由**磷酸果糖激酶-2(PFK-2)**和**果糖二磷酸酶-2(FBP 酶-2)**合成和降解它的速率之间的平衡(图 15-29)。这两个酶的活性定位在相同的约 100kDa 同源二聚蛋白质的不同结构域。这个双功能的酶被各种变构效应物调节,也被由 cAPK 和磷蛋白磷酸酶催化的磷酸化和脱磷酸化所调节。因此,葡糖异生和糖酵解之间的平衡受激素控制。

459

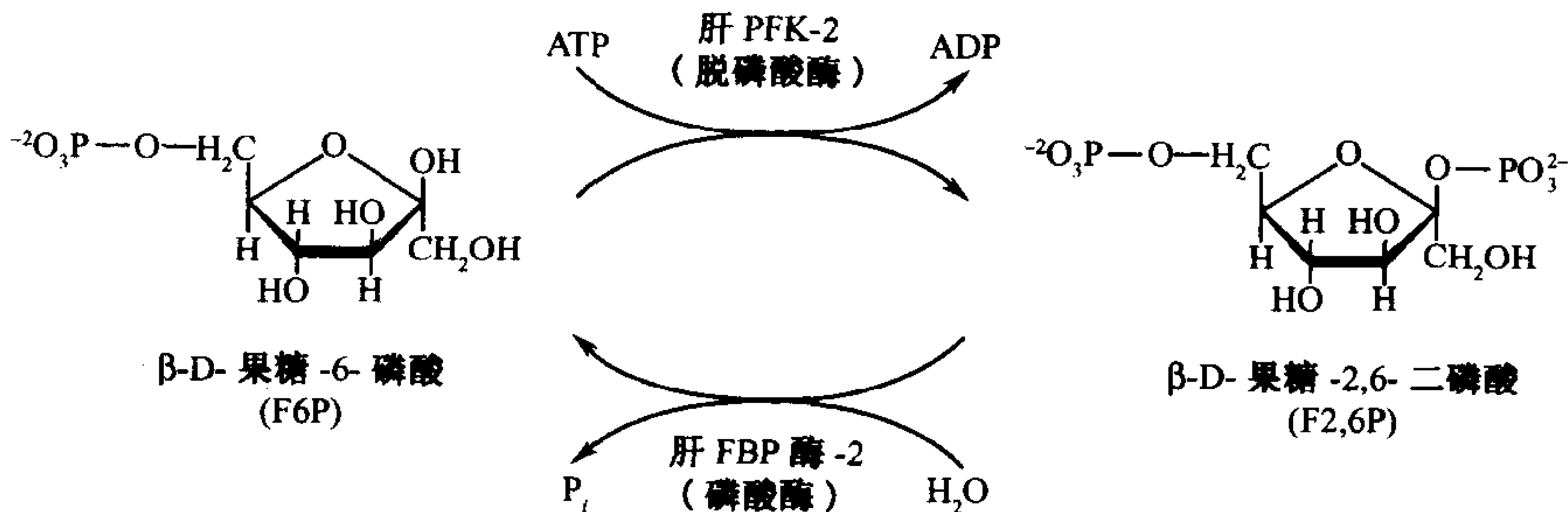


图 15-29 β-D-果糖-2,6-二磷酸(F2,6P)的形成和降解
磷酸果糖激酶-2(PFK-2)和果糖二磷酸酶-2(FBP 酶-2)的酶活性存在于同一蛋白质分子的不同结构域。肝中酶的脱磷酸化作用活化 PFK-2 而使 FBP 酶-2 失活。



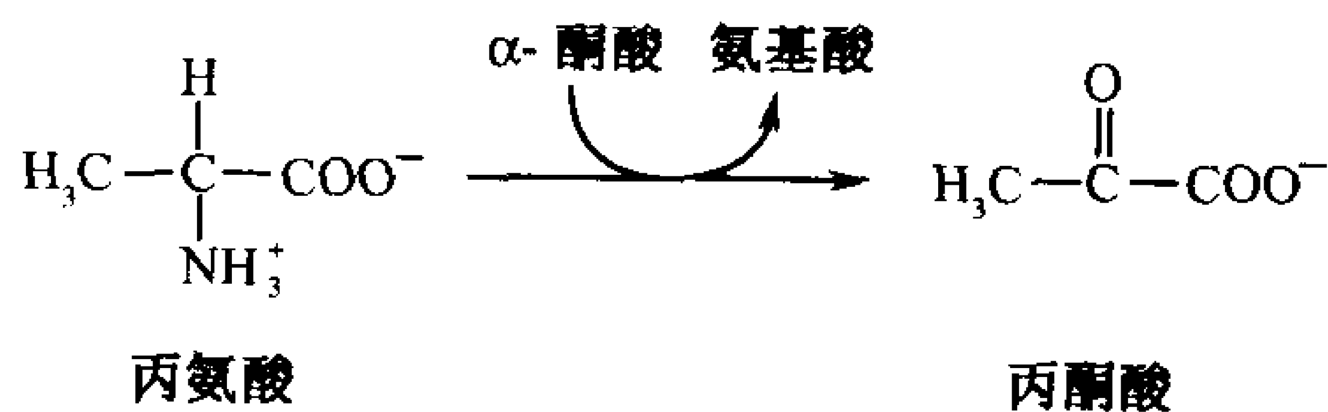
图 15-30 肝中连接低血[葡萄糖]与糖异生的代谢事件的顺序

例如，当[葡萄糖]低时胰高血糖素刺激肝细胞中cAMP的产生，这就活化cAPK，使PFK-2磷酸化并因而使之失活，以及磷酸化FBP酶-2并因而使之活化。净结果是F2，6P浓度降低，移动PFK和FBP酶反应之间的平衡向有利于FBP合成的方向，因而增加葡糖异生的通量（图15-30）。葡糖异生和糖原分解的协同增加使肝脏将葡萄糖释放到循环中。相反地，当血液[葡萄糖]高时，cAMP水平降低，所造成的[F2，6P]的增加促进糖酵解。

肌肉不是葡糖异生的组织，其F2，6P调控系统的功能与肝脏十分不同，这是因为存在不同的PFK-2/FBP酶-2同工酶。例如心肌中刺激糖原分解的激素使该双功能酶上一个位点磷酸化，这就活化而不是抑制PFK-2，结果F2，6P的增加刺激糖酵解，所以糖原分解和糖酵解是协调的。骨骼肌同工酶全然缺少磷酸化作用位点，因此不受依赖于cAMP的调控。

其他的变构效应物影响葡糖异生的通量

乙酰CoA活化丙酮酸羧化酶（节15-4A），但没有已知的PEPCK的变构效应物，它们与丙酮酸羧化酶一起使丙酮酸激酶反应逆向。然而丙酮酸激酶在肝中被一个主要的葡糖异生的前体丙氨酸变构地抑制。丙氨酸通过转移它的氨基给一个α-酮酸产生一个新的氨基酸和α-酮酸丙酮酸，这一过程称为**转氨基作用**（transamination；在节20-2A讨论）。肝的丙酮酸激酶也被磷酸化失活，进一步增加葡糖异生的通量。因为磷酸化作用也活化糖原磷酸化酶，葡糖异生和糖原分解的途径全部流向G6P，它再转化成葡萄糖供肝输出。



已糖激酶（或葡糖激酶，肝的同工酶）的活性也被调控，如我们将在节21-1D见到。相反地，葡萄糖-6-磷酸酶仅对可获得底物的水平作出应答，因而不是一个重要的调节点。

*葡萄糖代谢的长期调节不仅通过变构效应物来实现而且也通过合成的酶量的变化来完成。*胰腺和肾上腺的激素影响编码葡萄糖代谢中许多调节蛋白的mRNA的转录速率。例如，低浓度胰岛素或高浓度胞内cAMP促进PEPCK、FBP酶和葡萄糖-6-磷酸酶基因的转录，并阻遏葡糖激酶、PFK以及PFK-2/FBP酶-2双功能酶基因的转录。

5. 其他的碳水化合物生物合成途径

460

肝脏依靠其质量和代谢的方法主要负责维持循环中葡萄糖的恒定水平。由葡糖异生作用或从糖原分解产生的葡萄糖从肝脏释出被其他组织用作能源。当然，在肝脏和其他地方葡萄糖还有其他用途，例如合成乳糖（见框15-3）。

核苷酸糖提供糖苷键形成的动力

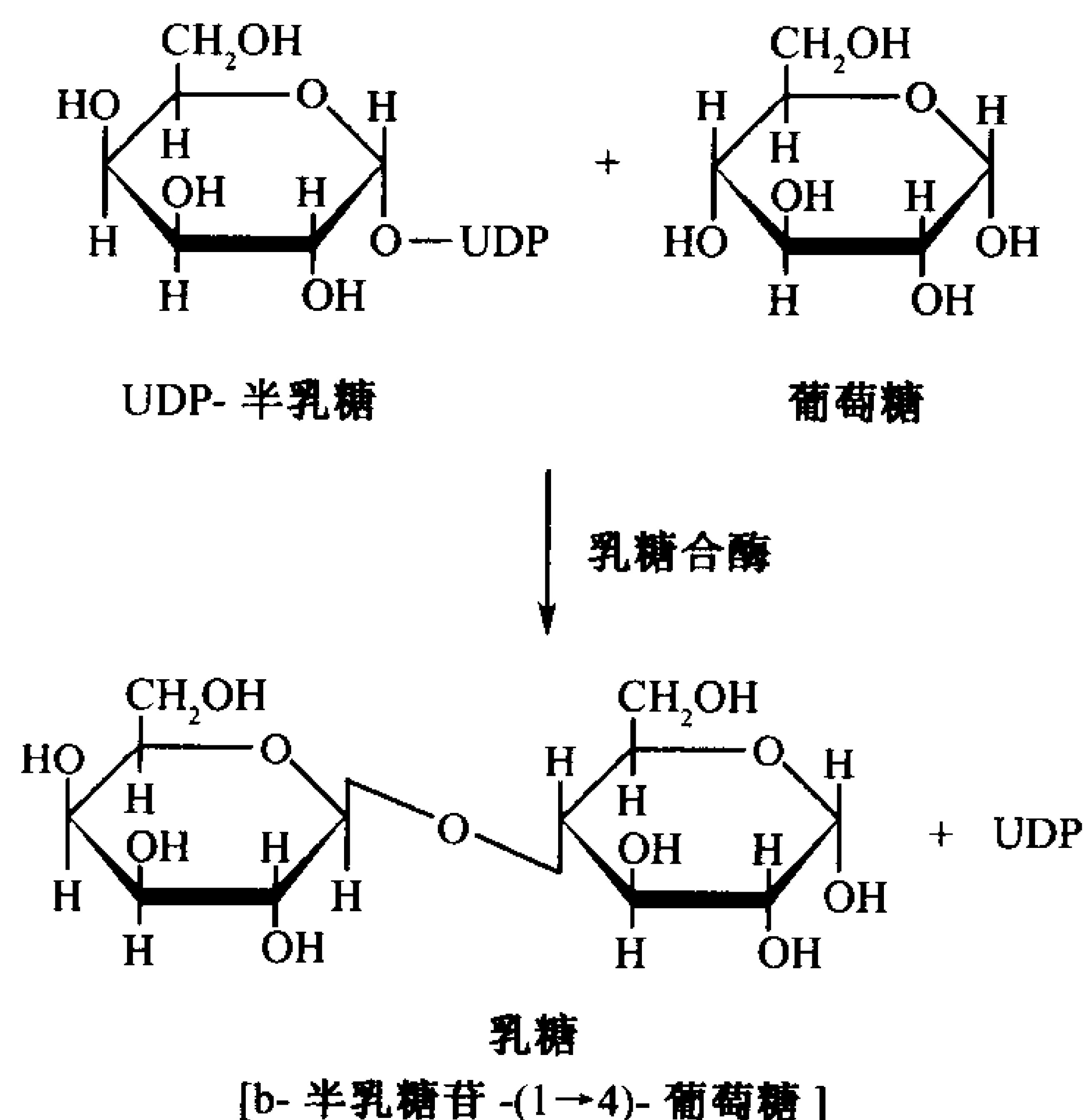
葡萄糖和其他的单糖（主要是甘露糖，*N*-乙酰葡糖胺，果糖，半乳糖，*N*-乙酰神经氨酸和*N*-乙酰半乳糖胺）存在于糖蛋白和糖脂中。糖与糖或其他分子连接形成糖苷键时在生理条件下需要输入自由能（$\Delta G^{\circ\prime}=16\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$）。尤如我们已在糖原合成（节15-2A）中所见，这种自由能的获得是通过一个核苷酸糖的磷酸酯键的断裂，释放PP_i，它的放能水解驱动该反应。在糖的异头碳原子上的核苷二磷酸是一个离去基团，因而促使与另一个糖形成糖苷键，这个反应是由糖基转移酶催化的（图15-31）。哺乳动物中大多数糖基是由UDP-糖供给的，但墨角藻糖和甘露糖是

461 由 GDP 携带的，而唾液酸则由 CMP 携带。在植物中，淀粉是由 **ADP-葡萄糖**(ADP-glucose)供给的葡萄糖单位构建的，而纤维素合成则依靠 **ADP-葡萄糖**(ADP-glucose)或 **CDP-葡萄糖**(CDP-glucose)。

框 15-3 生物化学焦点

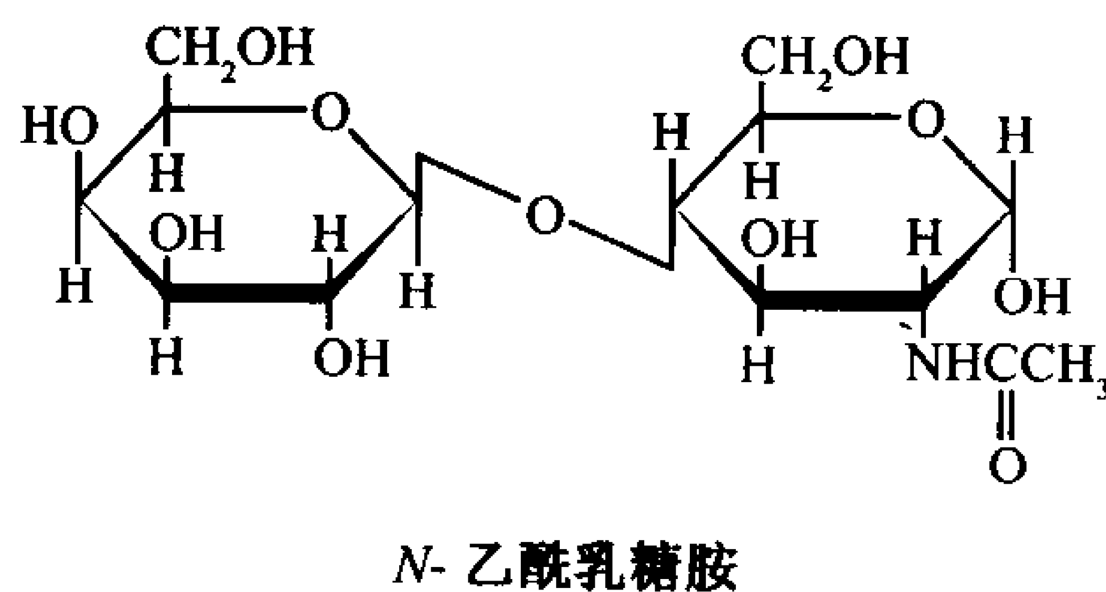
乳糖合成

像植物中的蔗糖一样，乳糖是一个二糖，为了以后用作代谢燃料，在这种情况下，被很年轻的哺乳动物在消化以后合成。乳糖在乳腺中由乳糖合酶产生。在这个反应里，供体糖是 UDP-半乳糖，它是由 UDP-葡萄糖的表异构化作用形成的(图 14-27)。受体糖是葡萄糖：



因此，乳糖的两个糖单位最终是从葡萄糖衍生的。乳糖合酶由两个亚基组成：

1) 半乳糖基转移酶，这个催化的亚基存在于许多组织，在那里它催化 UDP-半乳糖和 *N*-乙酰葡糖胺的反应产生 *N*-乙酰乳糖胺，



它是许多复杂寡糖的一个组分。

2) α-乳清蛋白，一个无催化活性的乳腺蛋白质，改变半乳糖基转移的专一性，所以它使用葡萄糖作受体，而非 *N*-乙酰葡糖胺，形成乳糖而不是 *N*-乙酰乳糖胺。

α-乳清蛋白的序列有 37% 与溶菌酶(它也参与包含糖的反应)同源，其合成由分娩(出生)时激素的变化所触发，由此促进乳糖合成而产乳。

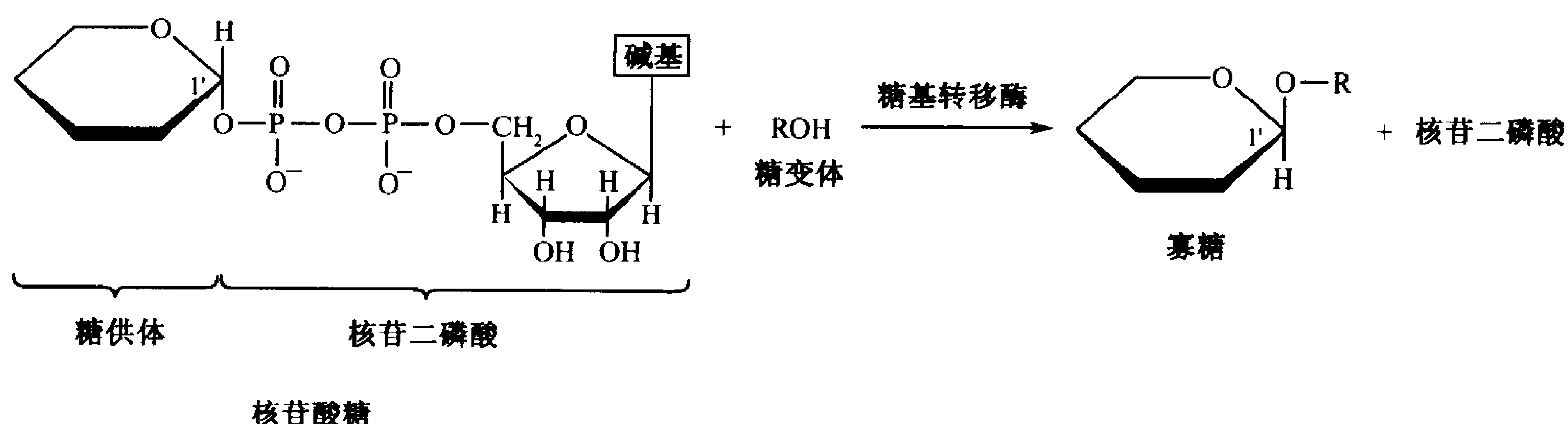


图 15-31　核苷酸糖的作用

这些化合物在由糖基转移酶催化的寡糖生物合成反应中是糖基供体。

O-连接的寡糖是翻译后形成的

在合成 *O*-连接的寡糖和在加工糖蛋白的 *N*-连接的寡糖中(节 8-3C)核苷酸糖是供体。*O*-连接的寡糖是在高尔基体中由一系列单糖单位加成到一个完全多肽链上合成的(图 15-32)。合成的开始被 **GalNAc 转移酶**催化,转移 UDP-GalNAc 的 *N*-乙酰半乳糖胺(GalNAc)到多肽的一个 Ser 或 Thr 残基上。糖基化作用位点的位置被认为是由多肽的二级或三级结构指定的。随着糖的逐步加成,糖苷化继续,如半乳糖、唾液酸,*N*-乙酰葡糖胺和果糖。在每种情况下,糖残基被相应的糖基转移酶从它的核苷酸二磷酸衍生物转移。

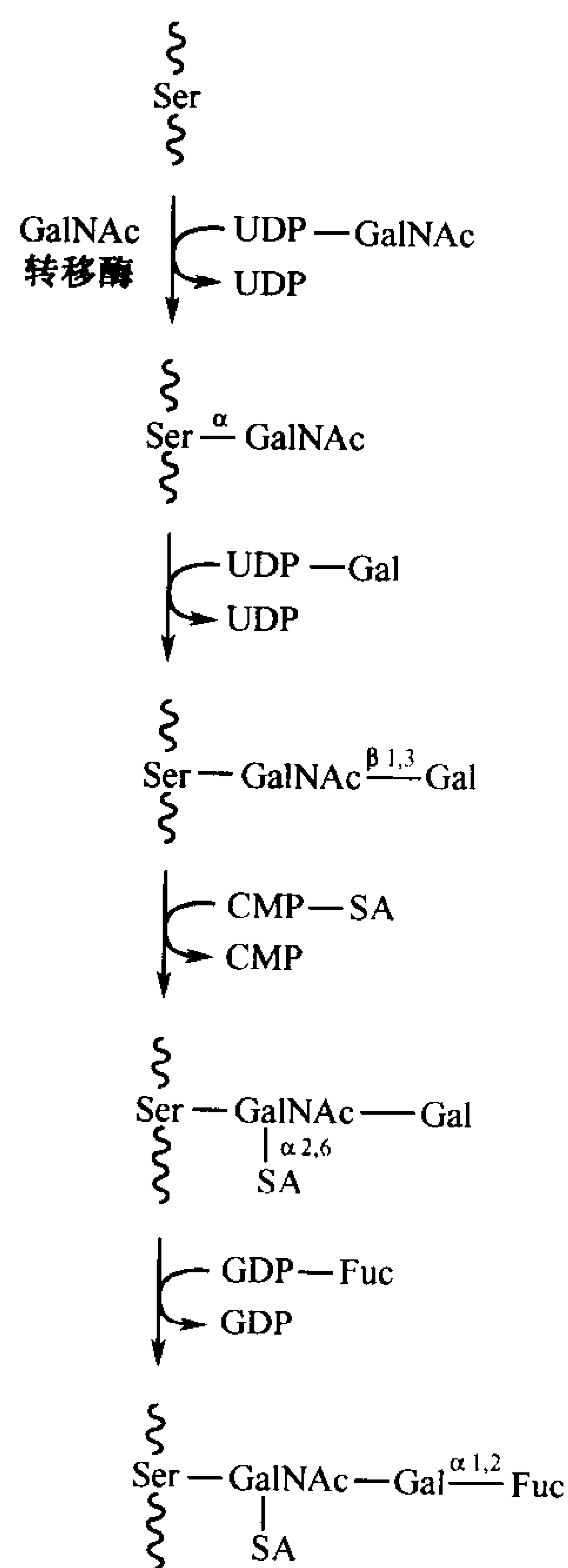


图 15-32　一个 *O*-连接的寡糖链的合成

这条途径表示装配犬下颚黏蛋白一个碳水化合物部分的建议的步骤。SA 是唾液酸。

N-连接的寡糖构建在多萜醇载体上

N-连接的寡糖合成比 *O*-连接的寡糖的合成复杂得多。在 *N*-连接的寡糖合成的早期,糖残基依次加到一个脂类载体**多萜醇焦磷酸**(dolichol pyrophosphate)上(图 15-33)。多萜醇是一种长链的聚异戊二烯,动物中含 17 到 21 个异戊二烯单位,真菌和植物含 14 到 25 个单位,它使增长着的寡糖固定到内质网膜上,该处发生初始的糖基化反应。

虽然糖基转移酶反应中核苷酸糖是最普通的单糖供体,但数个甘露糖和葡糖残基从它们相应的多萜醇-P 衍生物转移到增长着的多萜醇-PP-寡糖上。多萜醇磷酸"活化"糖残基用作随后的转移,如同一个核苷酸二磷酸所做的那样。

462

如节 8-3C 所述,一个 *N*-连接寡糖的构成从合成带有组分为(*N*-乙酰葡糖胺)$_2$(甘露糖)$_9$(葡萄糖)$_3$ 的寡糖开始,这发生在一个多萜醇载体上,被一系列专一的糖基转移酶催化,共 12 步反应(图 15-34)。注意,这些反应的一部分发生在内质网的内腔表面上,而其他的发生在它的胞质表面上。因此,在 4 种场合下(图 15-34 中的反应 3,5,8 及 11),多萜醇和它附着的亲水基被移位,通过未知的机制通过

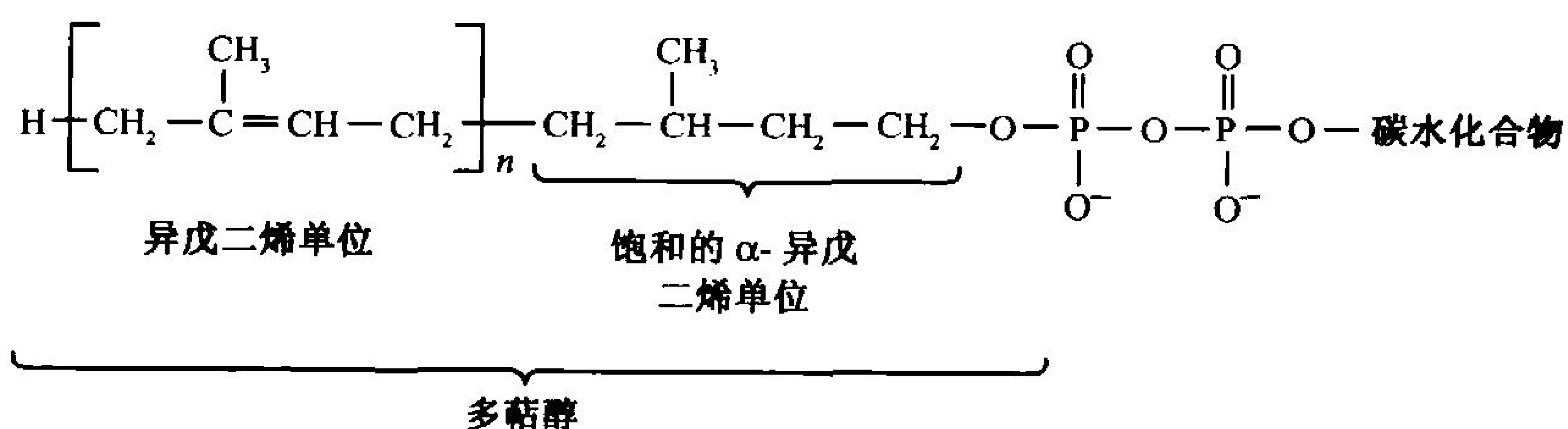


图 15-33　多萜醇焦磷酸糖苷

当寡糖附着到多萜醇上时合成 *N*-连接糖苷的碳水化合物前体。多萜醇是一长链的聚异戊二烯醇($n = 14 \sim 25$)，其中 α-异戊二烯单位是饱和的。

◆ = 葡萄糖　▼ = 甘露糖
● = *N*-乙酰葡萄糖胺　∿∿-P = 多萜醇磷酸

图 15-34　多萜醇-PP-寡糖合成途径

(1)*N*-乙酰葡糖胺-1-P 和另一个 *N*-乙酰葡糖胺加到多萜醇-P 上。(2)从 GDP-甘露糖加上 5 个甘露糖残基，反应由 5 个不同的甘露糖基转移酶催化。(3)多萜醇-PP-(*N*-乙酰葡糖胺)$_2$(甘露糖)$_5$ 膜移位到内质网(ER)的腔内。(4)从 GDP-甘露糖和多萜醇-P 在胞液内合成多萜醇-P-甘露糖。(5)多萜醇-P-甘露糖膜移位到 ER 的腔内。(6)从多萜醇-P-甘露糖加上 4 个甘露糖残基，反应被 4 个不同的甘露糖基转移酶催化。(7)从 UDPG 和多萜醇-P 在胞液内合成多萜醇-P-葡萄糖。(8)多萜醇-P-葡萄糖膜移位到 ER 的腔内。(9)从多萜醇-P-葡萄糖加上 3 个葡萄糖残基。(10)从多萜醇-PP 转移寡糖到多肽链的 Asn 残基，其序列是 AsnX-Ser/Thr，并释放多萜醇-PP。(11)多萜醇-PP 移位到 ER 膜的胞质表面。(12)多萜醇-PP 水解成多萜醇-P。(13)多萜醇被 CTP 磷酸化也能形成多萜醇-P。[引自 Abeijon, c. and Hirschberg, C. B., Trends Blochem. Scl. 17, 34(1992)，稍作改动]

内质网膜。在这个过程的最后步骤,寡糖转移到正在增长的多肽链的序列为 Asn-X-Ser/Thr(此处 X 是除 Pro 以外的任何残基,可能是 Asp)片段的 Asn 残基上,产生的多萜醇焦磷酸水解成多萜醇磷酸和 P_i,一个类似于焦磷酸酶分解 PP_i 成 $2P_i$ 的过程。如节 8-3C 所述,寡糖的进一步加工首先发生在内质网,然后在高尔基体中(图 8-16),在那里某些单糖残基被专一的糖基酶修剪掉,而其他的残基被需要特定核苷酸糖的糖基转移酶加上去。

杆菌肽干扰多萜醇焦磷酸的去磷酸化作用

许多化合物妨碍特定的糖基化酶的作用,包括**杆菌肽**(bacitracin)(图 15-35),它是一个环状的多肽,广泛使用的抗生素。杆菌肽与多萜醇焦磷酸形成复合物抑制其去磷酸化作用(图 15-34,反应 12),因而阻碍从多萜醇连接的寡糖前体合成糖蛋白。杆菌肽在临床是有用的,因为它抑制细菌细胞壁的合成(也包括多萜醇连接的寡糖),但不影响动物细胞,因为它不能穿过细胞膜(细菌细胞壁合成是一个胞外过程)。

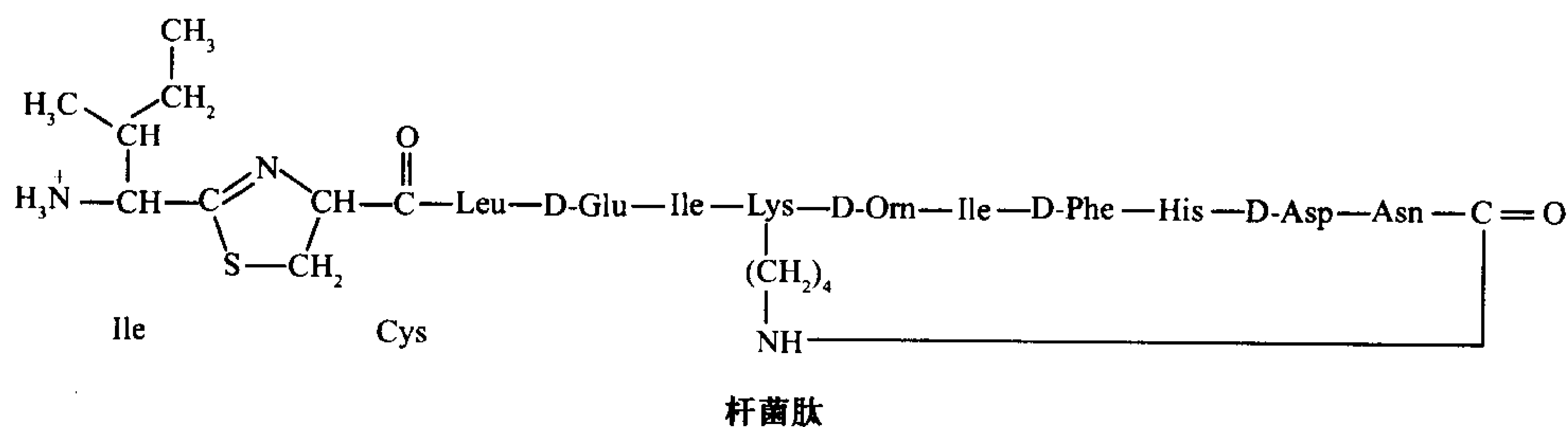


图 15-35　杆菌肽的化学结构

注意这个十二肽有 4 个氨基酸残基和 2 个不寻常的链内键,"Orn"代表非标准氨基酸鸟氨酸(图 20-8)。

小　结

1. 糖原分解需要三个酶。糖原磷酸化酶将糖原非还原末端的葡糖单位转化成葡萄糖-1-磷酸(G1P)。脱支酶将一个 α(1→4)连接的三糖转移到一个非还原末端并水解 α(1→6)键。磷酸葡糖变位酶将 G1P 转化成葡萄糖-6-磷酸(G6P),肝中 G6P 被葡萄糖-6-磷酸酶水解成葡萄糖输出到其他组织。
2. 糖原合成需要一条不同的途径,其中 G1P 经与 UTP 反应被活化形成 UDP-葡萄糖。糖原合酶将葡糖单位加到已被糖原素引发的增长的糖原分子的非还原末端上。分支酶移去一个 α(1→4)连接的七残基片段,并通过一个 α(1→6)键重新连上形成一条分支链。
3. 糖原代谢部分受变构效应物调控,如 AMP、ATP 和 G6P。糖原磷酸化酶和糖原合酶的共价修饰移动它们的 T ⇌R 平衡并进而改变它们对变构效应物的灵敏度。
4. 磷酸化酶 a 和磷酸化酶 b 的比率依赖于磷酸化酶激酶的活性,该激酶被依赖 cAMP 的蛋白激酶(cAPK)的活性调节;该比率还依赖于磷蛋白磷酸酶-1 的活性。糖原磷酸化酶被磷酸化作用活化,但糖原合酶被脱磷酸化作用活化。
5. 激素如胰高血糖素、肾上腺素和胰岛素调控糖原代谢。激素信号产生作为第二信使的 cAMP 或提高胞内 Ca^{2+}(它与磷酸化酶激酶的钙调蛋白亚基结合),促进糖原分解,胰岛素部分因活化磷蛋白磷酸酶-1 而刺激糖原合成。
6. 能被转化成草酰乙酸的化合物能接着被转化成葡萄糖。丙酮酸由葡糖异生作用转化成葡萄糖需要将糖酵解

三个放能步骤旁路的酶：丙酮酸羧化酶和 PEP 羧激酶（PEPCK）旁路丙酮酸激酶，果糖-1，6-二磷酸酶（FBP 酶）旁路磷酸果糖激酶，而葡萄糖-6-磷酸酶旁路己糖激酶。

7. 葡糖异生作用的调节是由于酶合成的变化和变构效应物，包括果糖-2，6-二磷酸（F2，6P），它抑制 FBP 酶并活化磷酸果糖激酶（PFK），而它的合成依赖于双功能酶磷酸果糖激酶-2/果糖二磷酸酶-2（PFK-2/FBP 酶-2）的磷酸化状态。
8. 糖苷键的形成需要核苷酸糖。

参考文献

Barford, D. and Johnson, L.N., Electrostatic effects in the control of glycogen phosphorylase by phosphorylation, *Protein Sci.* **3**, 1726–1730 (1994).

Browner, M.F. and Fletterick, R.J., Phosphorylase: a biological transducer, *Trends Biochem. Sci.* **17**, 66–71 (1992).

Calder, P., Glycogen structure and biogenesis, *Int. J. Biochem.* **23**, 1335–1352 (1991).

Chen, Y.-T. and Burchell, A., Glycogen storage diseases, *in* Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., and Frederickson, D.S. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (7th ed.), Chapter 24, McGraw–Hill, New York (1995). [Includes a review of glycogen metabolism.]

Johnson, L.N., Noble, M.E., and Owen, D.J., Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation, *Cell* **85**, 149–158 (1996).

Meléndez-Hevia, E., Waddell, T.G., and Shelton, E.D., Optimization of molecular design in the evolution of metabolism: the glycogen molecule, *Biochem. J.* **295**, 477–483 (1993).

Pilkis, S.J. and Granner, D.K., Molecular physiology of the regulation of hepatic gluconeogenesis and glycolysis, *Annu. Rev. Physiol.* **54**, 885–909 (1992).

Pilkis, S.J., Claus, T.H., Kurland, I.J., and Lange, A.J., 6-Phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: a metabolic signaling enzyme, *Annu. Rev. Biochem.* **64**, 799–835 (1995).

Shulman, R.G., Bloch, G., and Rothman, D.L., *In vivo* regulation of muscle glycogen synthase and the control of glycogen synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**, 8535–8542 (1995).

Zhang, M., Tanaka, T., and Ikura, M., Calcium-induced conformational transition revealed by the solution structure of apo calmodulin, *Nature Struct. Biol.* **2**, 758–767 (1995).

关 键 词

糖原分解 glycogenolysis
磷酸解 phosphorolysis
脱支 debranching
核苷酸糖 nucleotide sugar
能互变的酶 interconvertible enzyme
cAMP
钙调素 CaM
第二信使 second messenger
糖异生作用 gluconeogenesis
还原当量 reducing equivalent
糖原贮积病 glycogen storage disease

学习思考题

1. 列出 G6P 的代谢来源和产物。
2. 糖原的结构和它的代谢功能的关系如何？
3. 叙述糖原的酶降解和合成。
4. 为什么正相反的生物合成和降解途径必须至少有一个酶不同？
5. 为什么一个磷酸化/去磷酸化系统比一个简单的变构系统能更灵敏地调节一个代谢过程？
6. 糖原代谢的调节在肝和肌肉中如何不同？
7. 叙述糖异生反应。
8. 为什么苹果酸-天冬氨酸穿梭系统对葡糖异生作用是重要的？
9. 叙述果糖-2，6-二磷酸在调节糖异生中的作用。

练　习　题

1. 写出平衡方程式：(a)连续转化葡萄糖成丙酮酸以及丙酮酸到葡萄糖，(b)6 分子 G6P 被磷酸戊糖途径分解代谢，随后核酮糖-5-磷酸被葡糖异生作用转化回到 G6P。
2. 磷酸葡糖激酶催化 G1P 的 C6 OH 基的磷酸化，为什么这个酶对于磷酸葡糖变位酶的正常功能是重要的？
3. 一个 α(1→4)糖苷键水解的自由能是 $-15.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$，而 α(1→6)糖苷键则是 $-7.1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$。使用这些数据说明为什么糖原脱支包含三个反应[断裂和重新形成 α(1→4)键以及水解 α(1→6)键]，而糖原分支只需要两个反应[断裂 α(1→4)键和形成 α(1→6)键]。
4. 根据一个葡萄糖残基的容积和细胞糖原的分支花样计算指出，一个糖原分子在密度不可能再变大之前能有 28 分支层，这样一个分子的优点是什么以及为什么活体中未发现？
5. 一分子饮食的葡萄糖通过糖酵解和柠檬酸循环能被氧化生成最高 38 分子 ATP，计算葡萄糖以糖原贮存，在被分解代谢之前损失的能量部分。
6. 许多糖尿病患者对胰岛素无反应，因为在他们的细胞中缺失胰岛素受体，这如何影响(a)在饭后即时循环葡萄糖的水平以及(b)肌肉中糖原合成的速度？
7. 咖啡因抑制 cAMP 磷酸二酯酶。这是如何影响对肾上腺素的代谢回应？
8. 葡萄糖-6-磷酸酶是位于内质网内。叙述缺失穿过内质网膜运输 G6P 的可能症状。
9. 有 McArdle 氏病的个人常会体验一种"恢复常态"，起因是心血管调节，它使来自肝糖原的葡萄糖作为肌肉收缩的燃料。解释为什么肌肉中从循环的葡萄糖衍生的 ATP 的量比从肌糖原动用同样量的葡萄糖获得的 ATP 要少。
10. 将一肝病患者的糖原样品与 P_i，标准的糖原磷酸化酶以及标准的脱支酶保温。该反应混合物形成的 G1P 与葡萄糖之比是 100。该病人最可能缺失的酶是什么？

(清华大学　刘祖同　中科院微生物研究所　易祖华　译　郑昌学　校)

第 16 章　柠檬酸循环



许多生物物质的合成和降解，取决于经柠檬酸循环的分子和能量的流动。柠檬酸循环好比代谢的水轮。(引自 Lyle Leduc/Gamma Liaison)

在前面两章中，我们讨论了葡萄糖的分解代谢和它的合成、贮存和转移。虽然葡萄糖是几乎所有细胞的能源，但是它不是惟一的代谢燃料，糖酵解也不是惟一的产生能量的分解代谢途径。仅仅依赖糖酵解来满足能量需要的细胞，事实上浪费了糖的大部分化学势能。当葡萄糖转变为乳酸或乙醇时，相对还原的产物离开了细胞。假如糖酵解的终产物进一步氧化，则细胞能重新获得相当多的能量。

有机物的氧化需要电子受体，如 NO_3^-、SO_4^{2-}、Fe^{3+} 或 O_2，所有这些电子受体在不同的机体中作为氧化剂。在需氧生物中氧化过程产生的电子最终转移给 O_2。代谢燃料的氧化是通过柠檬酸循环进行的，柠檬酸循环是在大约 30 亿年前大气氧的含量变得重要以后出现的一个顺序反应。当代谢燃料的还原的碳原子被氧化成 CO_2 时，电子转给电子载体，电子载体随后被 O_2 氧化。在这章中我们要讨论柠檬酸循环本身的氧化反应，后面一章中我们将讨论电子的命运，以及它们的能量是怎样被利用来驱动 ATP 的合成。

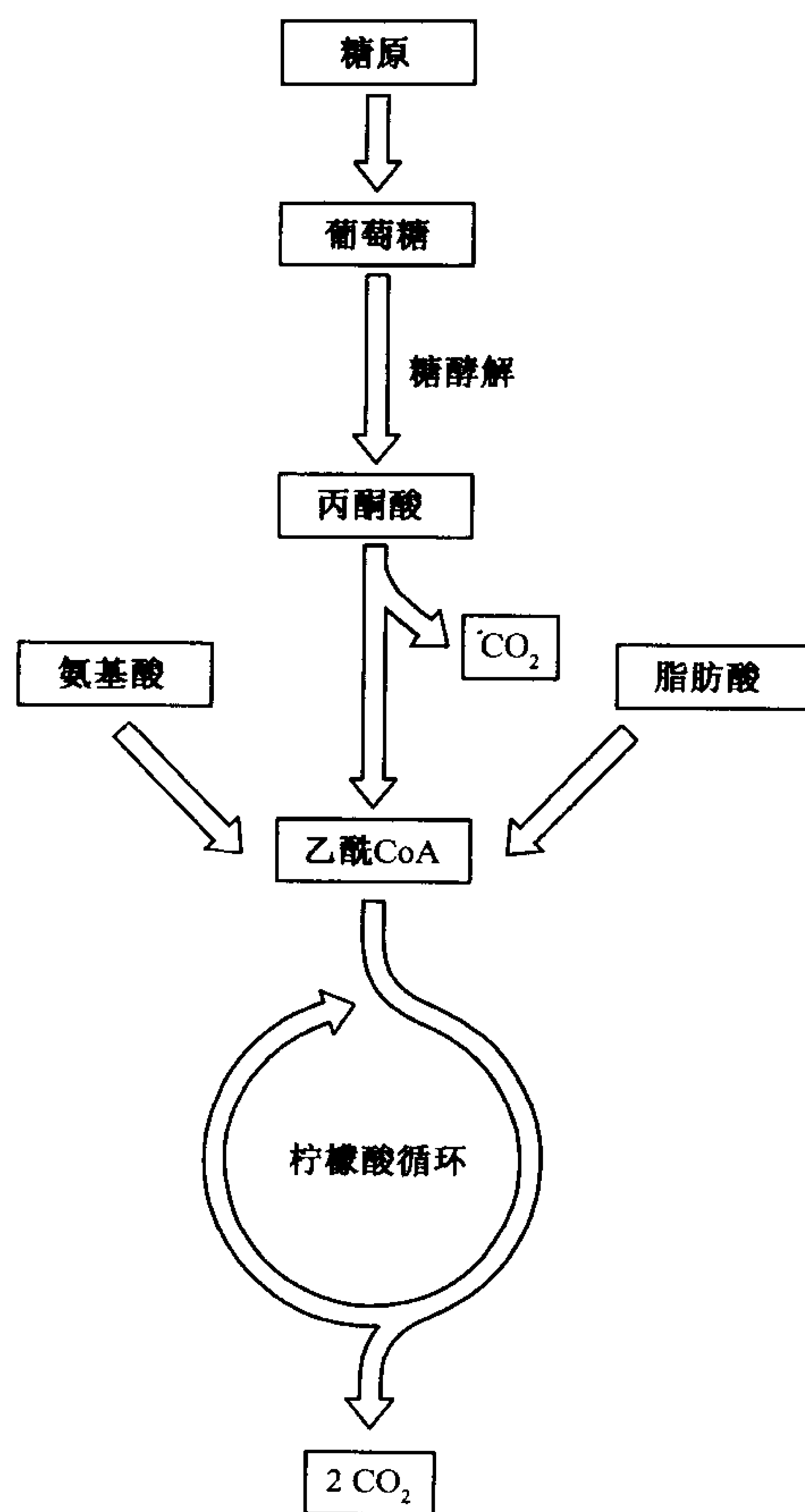


图 16-1　氧化性燃料的代谢总览
从糖、氨基酸和脂肪酸衍生而来的乙酰基进入柠檬酸循环，通过柠檬酸循环它们被氧化成 CO_2。

有时将柠檬酸循环看成是糖酵解的补充具有方便之处。从葡萄糖衍生而来的丙酮酸，能裂解为 CO_2 和一个二碳片段，该二碳片段以乙酰 CoA 的形式进入循环而被氧化（图 16-1）。然而认为柠檬酸循环仅仅是糖分解代谢的继续的观点是错误的。*柠檬酸循环是几种代谢燃料包括糖、脂肪酸和氨基酸回收能量的中心途径，这些代谢燃料裂解生成乙酰 CoA 而被氧化*。事实上在某些条件下，柠檬酸循环的主要功能是从脂肪酸那里回收能量，但是我们也将看到柠檬酸循环为各种生物合成途径提供反应物。

本章将从柠檬酸循环的总览开始，接着我们探讨怎样从丙酮酸形成该循环的起始化合物乙酰 CoA。在讨论该循环中每个酶催化的反应后，我们考虑这些酶的调节，最后我们研究柠檬酸循环的中间物和其他代谢过程之间的联系。

1. 柠檬酸循环总览

柠檬酸循环（图 16-2）是巧妙的连续的 8 步反应，通过这些反应，乙酰 CoA 的乙酰基氧化成两分子 CO_2，并以还原性化合物 NADH 和 $FADH_2$ 的形式保存释放的自由能。循环以它的第一个产物**柠檬酸**（citrate）命名。一个完整的循环产生 2 分子 CO_2、3 分子 NADH、1 分子 $FADH_2$ 和 1

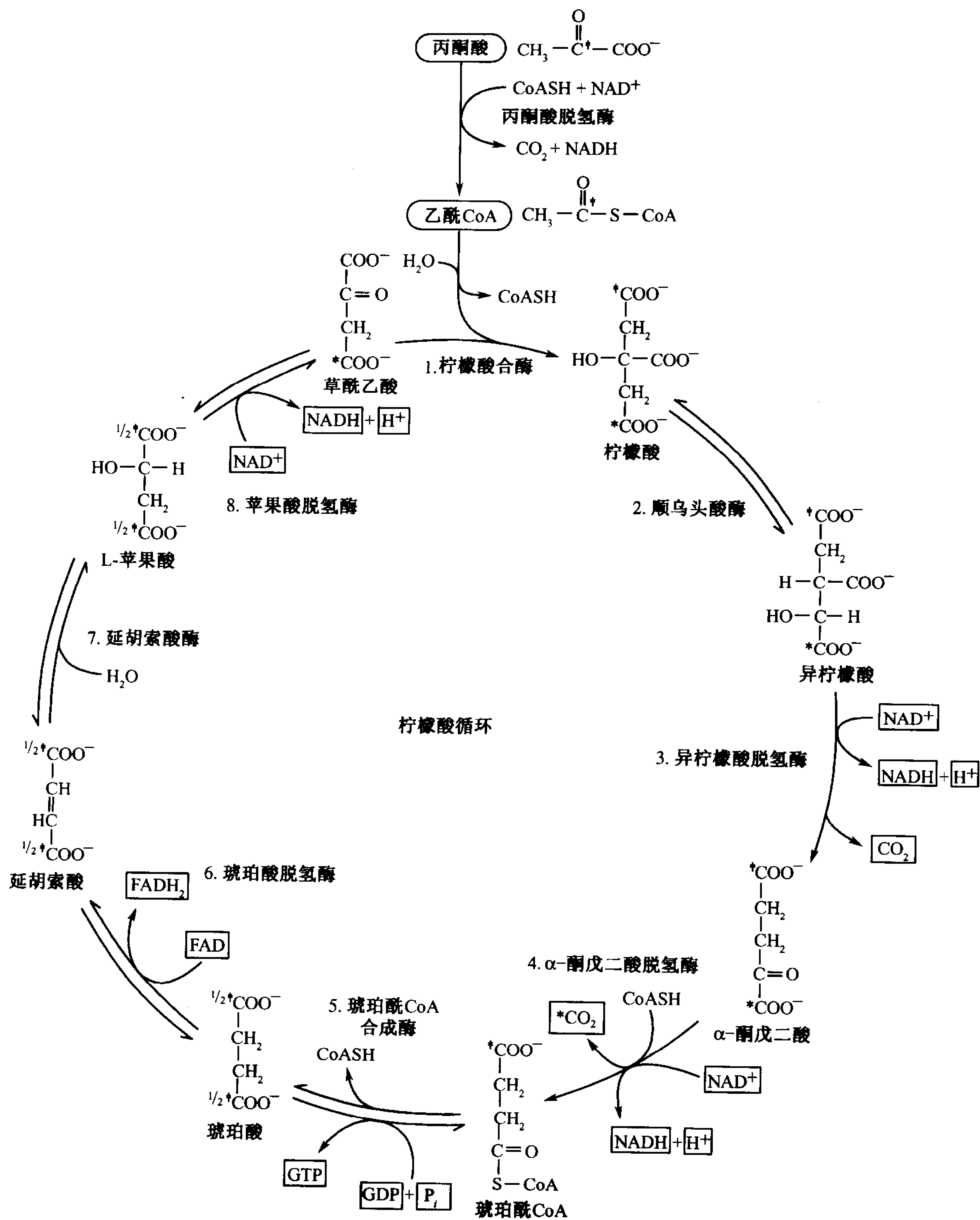


图 16-2 代谢的秘诀：柠檬酸循环的反应

这个循环的反应物和产物被框出。通过糖代谢生成的丙酮酸→乙酰 CoA 的反应(顶端)，供给柠檬酸循环的底物，这步反应并不考虑为循环的一部分。用同位素标记的草酰乙酸(*)的 C4 成为 α-酮戊二酸的 C1，它在反应 4 中作为 CO_2 被释放。同位素标记的乙酰-CoA(‡)的 C1 成为 α-酮戊二酸的 C5，它在反应 5 中在琥珀酸(1/2‡)的 C1 和 C4 之间被混杂。

个高能化合物(GTP 或 ATP)。

最早发现柠檬酸循环是在 20 世纪 30 年代,在那以前,葡萄糖氧化的机制以及它与细胞呼吸(氧的摄取)的关系是个谜。但是知道在呼吸过程中,各种二羧酸(**α-酮戊二酸、琥珀酸和苹果酸**)和三羧酸(柠檬酸)很快被肌肉组织氧化。1935 年 Albert Szent-Györgyi 发现少量的琥珀酸、延胡索酸、苹果酸或草酰乙酸可显著加快细胞呼吸。事实上,加入这些化合物刺激 O_2 的摄取和 CO_2 的产生,远远超过预期的这些化合物的直接氧化。*这些发现符合底物通过催化系统氧化反复回到它的起始点*。然而该途径的循环性本质的发现,需要额外的研究以决定 8 个中间物相互转变的顺序。1936 年当 Carl Martius 和 Franz Knoop 指出柠檬酸(第一个中间物)能从草酰乙酸(第八个中间物)和丙酮酸经非酶促形成时,这个环大体上被封闭了。

469

1937 年 Hans Krebs 利用这个化学模型作为生物化学实验的出发点,导致他提出柠檬酸循环,柠檬酸循环是代谢化学的最重要的成就之一。催化的循环概念对 Krebs 来说并不是新的,1932 年他和 Kurt Henseleit 阐明了尿素循环的轮廓,即尿素循环将 CO_2 和氨转变成排泄出去的尿素(见节 20-3)。然而对柠檬酸循环的完满解释还存在一些较大的空缺,例如,从丙酮酸和草酰乙酸形成柠檬酸的机制并不清楚。事实上直到 1945 年才发现 CoA,1951 年才知道乙酰 CoA 是中间物,该中间物与草酰乙酸缩合形成柠檬酸。虽然现在已完满地确定了柠檬酸循环的酶和中间物,但是许多研究者仍在继续探索酶作用的分子机制,以及在不同的有机体中和不同的代谢条件下,酶是怎样被调节的。

在我们详细考察每步反应之前,我们应该强调一下柠檬酸循环的一些基本特征:

1) 环形的途径,这途径也称 **Krebs 循环**(Krebs cycle)或**三羧酸**(tricarboxylic acid, TCA)循环,该途径不仅氧化从丙酮酸来的乙酰 CoA,也氧化许多其他来源的乙酰 CoA。因为它是糖、脂肪酸和氨基酸氧化的重要部分,因此柠檬酸循环也时常被认为是细胞代谢的“中心”。

2) 柠檬酸循环的净反应是:

$$3NAD^+ + FAD + GDP + P_i + \text{乙酰 CoA} \rightarrow 3NADH + FADH_2 + GTP + CoA + 2CO_2 + 3H^+$$

柠檬酸循环第一步消耗的草酰乙酸,在循环的最后一步再生,因此*柠檬酸循环是能氧化无限量乙酰 CoA 的多步催化反应*。

3) 在真核生物中,柠檬酸循环的所有酶都定位在线粒体内,因此所有的底物包括 NAD^+ 和 GDP 必须在线粒体内产生,或从胞质转运到线粒体内。与此类似,柠檬酸循环的所有产物一定在线粒体内积累,或转运到胞质中。

4) 循环一圈所产生的两分子 CO_2 的碳原子,并不是开始一轮乙酰基的两个碳(图 16-2),这些乙酰碳原子是在随后的一轮循环中失去。然而每一轮循环的净效应是 1 个乙酰基氧化成 2 个 CO_2。

5) 柠檬酸循环的中间物是其他物质生物合成的前体(如草酰乙酸是糖异生作用的前体,见节 15-4)。

6) 氧化 1 个乙酰基为 2 个 CO_2 需要转移 4 对电子,还原 $3NAD^+$ 为 3NADH 需要 3 对电子,还原 FAD 为 $FADH_2$ 需要第 4 对电子,乙酰基氧化的许多自由能保留在这些还原辅酶中。另外能量也在 GTP(或 ATP)中回收。在节 17-3C 中,我们看到当 4 对电子最终转给 O_2 时,生成 11 个 ATP。

470

2. 乙酰CoA的合成

乙酰基作为高能化合物乙酰 CoA 的一部分进入柠檬酸循环(回忆一下,硫酯有高的水解自由能,见节 13-2D)。虽然乙酰 CoA 也能从脂肪酸(见节 19-2)和一些氨基酸(见节 20-4)衍生而来,但是这里我们只集中于从糖代谢衍生而来的丙酮酸所产生的乙酰 CoA。

正如我们在节 14-3 中看到的,在厌氧条件下糖酵解的最终产物是乳酸或乙醇。然而在有氧条件下,当糖酵解产生的 NADH 在线粒体中重新氧化时,最终产物是丙酮酸。一个转运蛋白将丙酮酸和 H^+(也就是丙酮酸-H^+同向转运)一起引入线粒体,以便进一步氧化。

A. 丙酮酸脱氢酶多酶复合物

多酶复合物(multienzyme complex)是一组非共价结合的酶,在代谢途径中它们催化二个或更多的序列反应。事实上所有的生物都有多酶复合物,多酶复合物意味着催化效率在进化上前进了一步,因为它们具有如下优点:

1) 酶反应速率受限于酶和底物碰撞的频率(见节 11-3E),但是当一系列反应发生在多酶复合物中,底物在活性中心之间必须扩散的距离减到最小,因此反应速率增加。
2) 在代谢途径中,连续性酶反应之间的代谢中间物的通道运送减少了这些中间物与其他分子反应的机会,因此使副反应减到最小。
3) 多酶复合物催化的反应能被协同性调控。

乙酰 CoA 是由丙酮酸通过**丙酮酸脱氢酶**(pyruvate dehydrogenase)多酶复合物催化的氧化脱羧反应而生成。这个复合物包含 3 种酶的多个拷贝,即**丙酮酸脱氢酶**(E_1)、**二氢硫辛酸转乙酰基酶**(E_2)和**二氢硫辛酸脱氢酶**(E_3)。

大肠杆菌丙酮酸脱氢酶复合物是一个直径约 300Å 的 4600kDa 左右的颗粒(图 16-3a)。颗

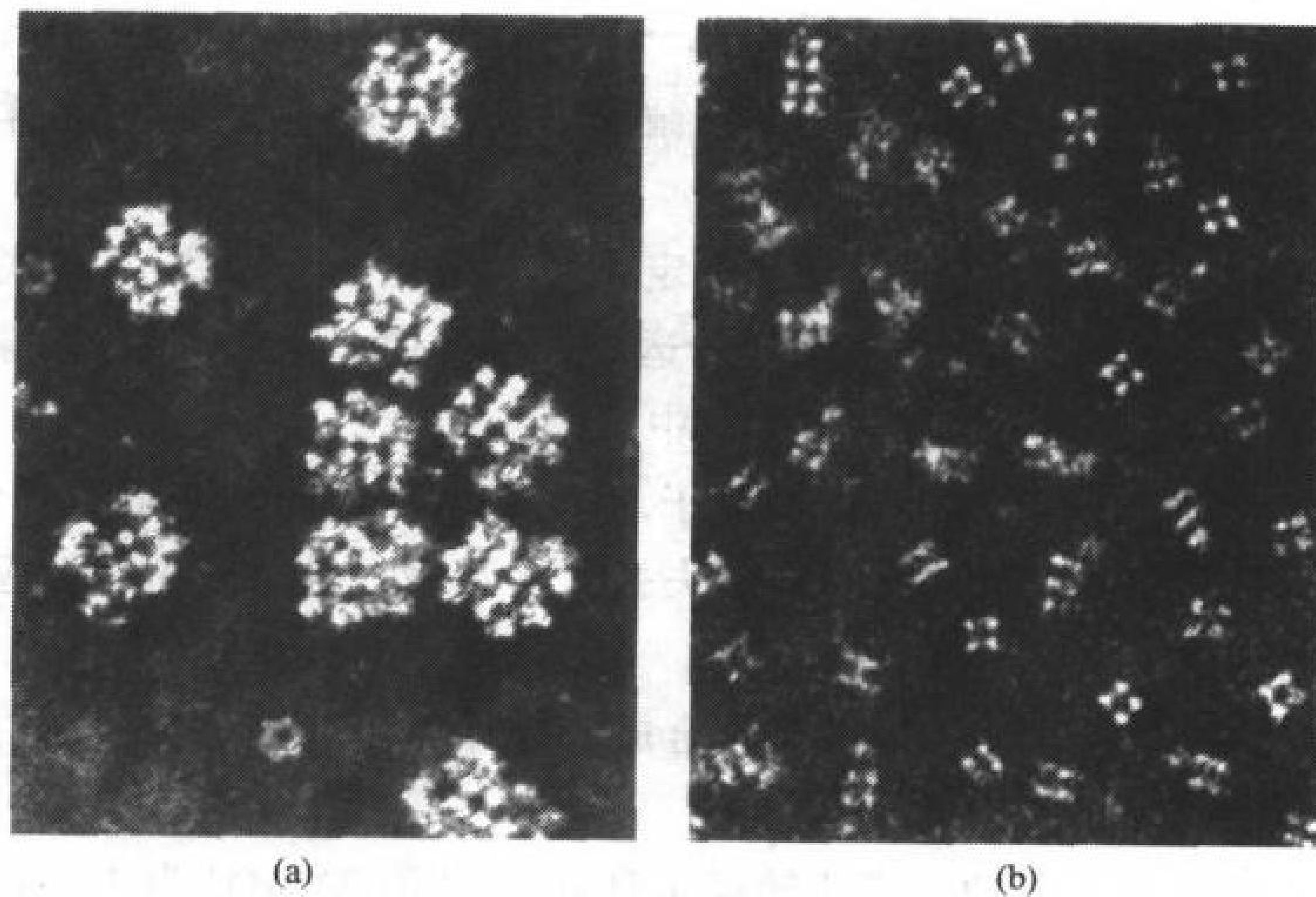
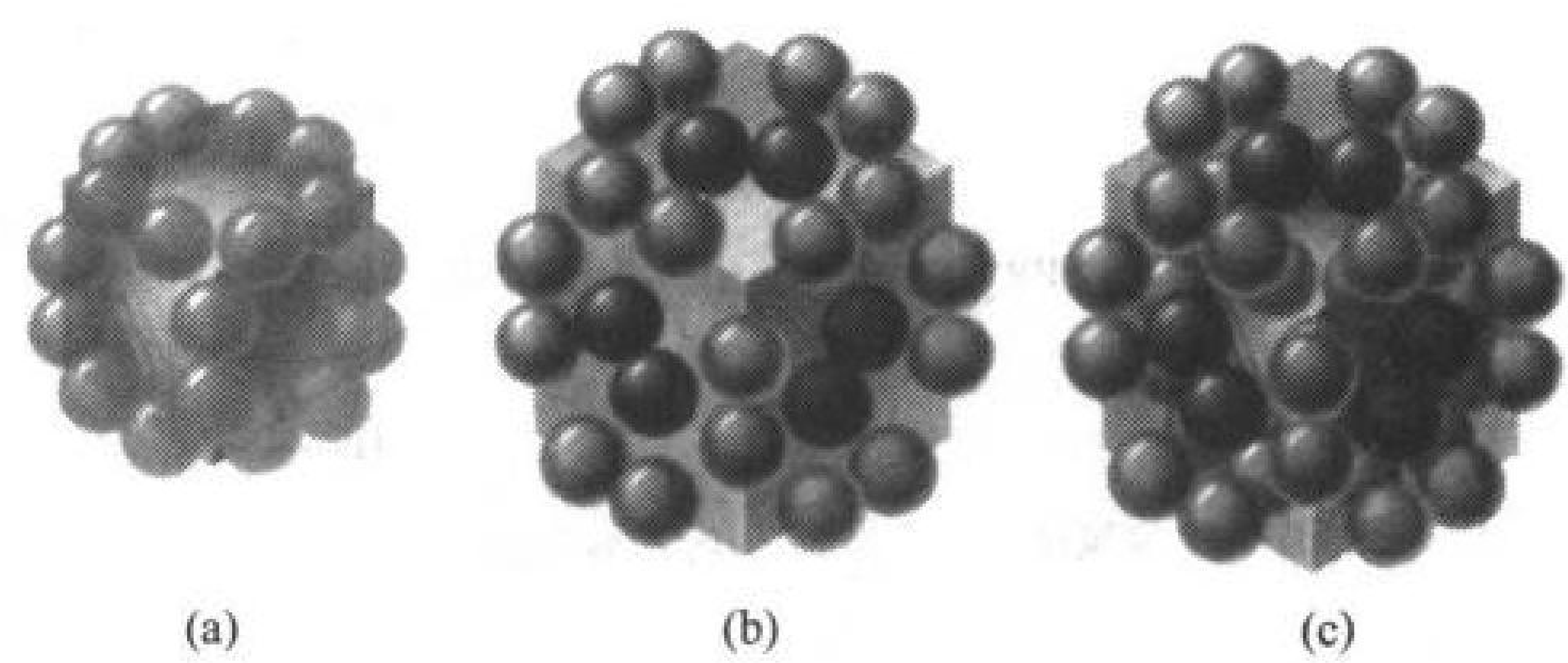


图 16-3 大肠杆菌丙酮酸脱氢酶多酶复合物的电子显微照片

(a)完整的复合物。(b)二氢硫辛酸转乙酰基酶(E_2)核心复合物。(引自 Lester Reed, University of Texas at Austin)

粒的核心是由以立方体排列的 24 个 E_2 蛋白质组成(图 16-3B)。24 个 E_1 蛋白质和 12 个 E_3 蛋白质围绕 E_2 核心排列(图 16-4)。



(a)　　(b)　　(c)

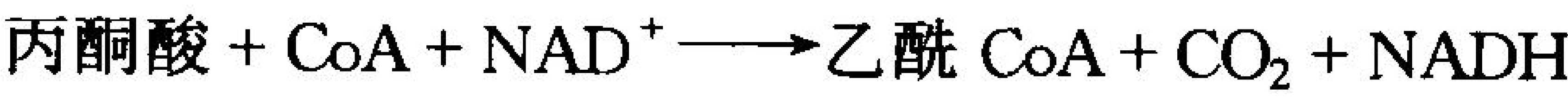
图 16-4　大肠杆菌丙酮酸脱氢酶多酶复合物的结构模型
(a)二氢硫辛酸转乙酰基酶(E_2)核心。24 个 E_2 蛋白质(绿色球)在立方体的角上以三聚体的形式缔合。(b)24 个丙酮酸脱氢酶(E_1)蛋白质(桔黄色球)形成二聚体,该二聚体与 E_2 核心(被遮蔽的立方体)沿它的 12 条边相缔合。12 个二氢硫辛酸脱氢酶(E_3)蛋白质(紫色球)形成二聚体,该二聚体附着在 E_2 立方体的 6 个面上。(c) a 部分和 b 部分结合形成完整的 60 个亚基的复合物。

真核生物的丙酮酸脱氢酶复合物比大肠杆菌丙酮酸脱氢酶复合物更为复杂,虽然它们通过类似的机制,以同源酶催化相同的反应。真核生物的丙酮酸脱氢酶复合物是一个十二面体(一个有 12 个五边形面的有规则的多面体),由 60 个 E_1 蛋白质和 12 个 E_3 蛋白质围绕 60 个 E_2 蛋白质核心组成。哺乳动物丙酮酸脱氢酶复合物还含有大约 6 个拷贝的所谓**蛋白质 X**(protein X,无催化活性的类 E_2 蛋白质,它能帮助 E_3 结合到复合物上)、1～3 个拷贝的**丙酮酸脱氢酶激酶**和**丙酮酸脱氢酶磷酸酶**(它们通过磷酸化和脱磷酸化的机制调节复合物的活性,见节 16-4A)。

471

B. 丙酮酸脱氢酶复合物催化的反应

丙酮酸脱氢酶复合物催化 5 步顺序反应,其总反应式为:



$$\text{丙酮酸} + CoA + NAD^+ \longrightarrow \text{乙酰 } CoA + CO_2 + NADH$$

需要 5 种不同的辅酶:硫胺素焦磷酸(TPP;见节 14-3B)、**硫辛酰胺**(lipcamide)、CoA(图 13-9)、FAD(图 3-3)和 NAD^+(图 3-4),辅酶和它们的功能列在表 16-1 中。丙酮酸脱氢酶复合物催化的顺序反应如下(图 16-5):

表 16-1　丙酮酸脱氢酶的辅酶和辅基

辅因子	定　位	功　能
硫胺素焦磷酸(TPP)	结合到 E_1 上	使丙酮酸脱羧产生羟乙基-TPP 负碳离子
硫辛酸	共价连接到 E_2 的 Lys 上(硫辛酰胺)	从 TPP 上接受羟乙基负碳离子形成乙酰基
辅酶 A(CoA)	E_2 的底物	从硫辛酰胺上接受乙酰基
黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)	结合到 E_3 上	被硫辛酰胺还原
烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD^+)	E_3 的底物	被 $FADH_2$ 还原

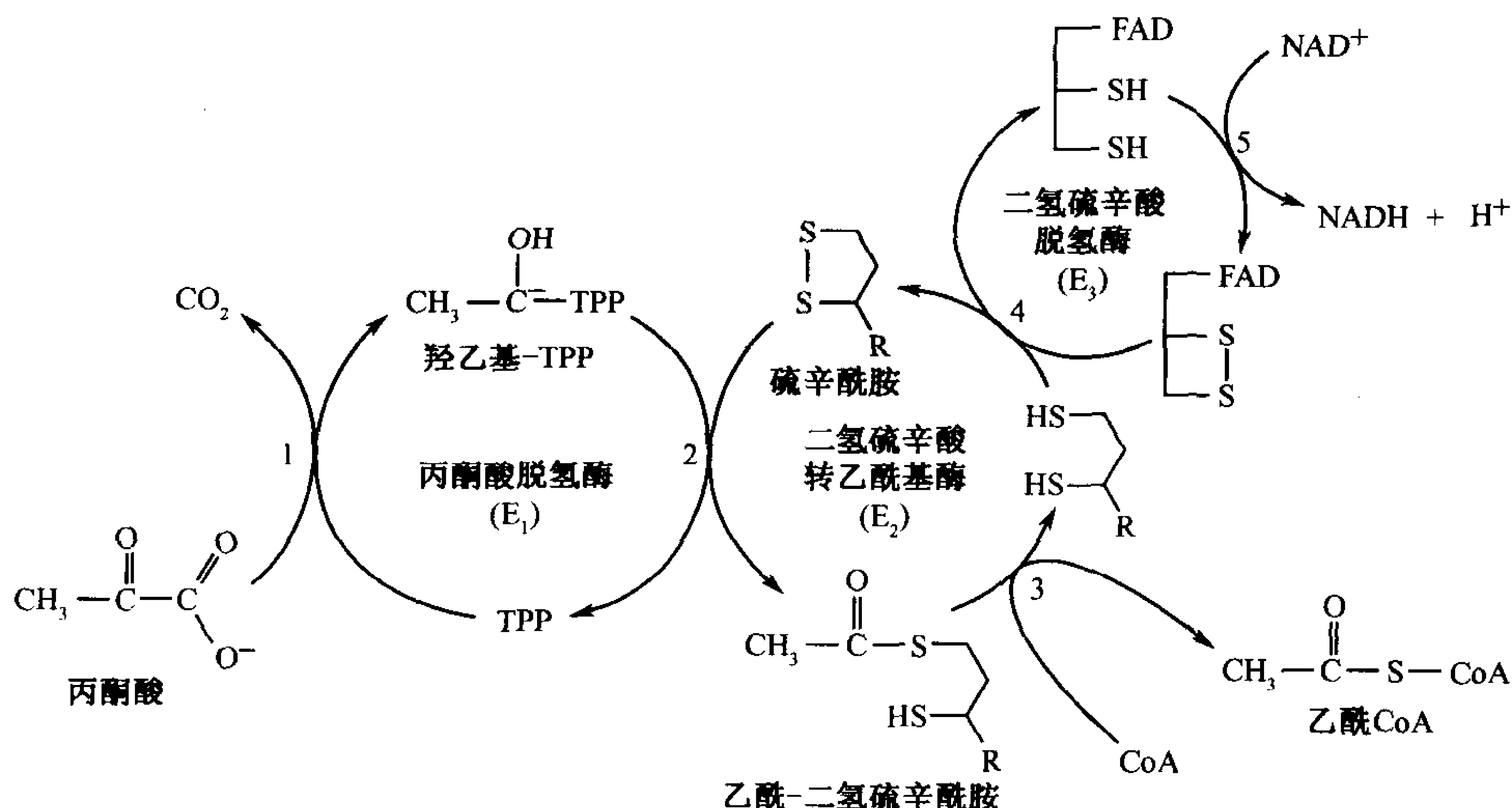
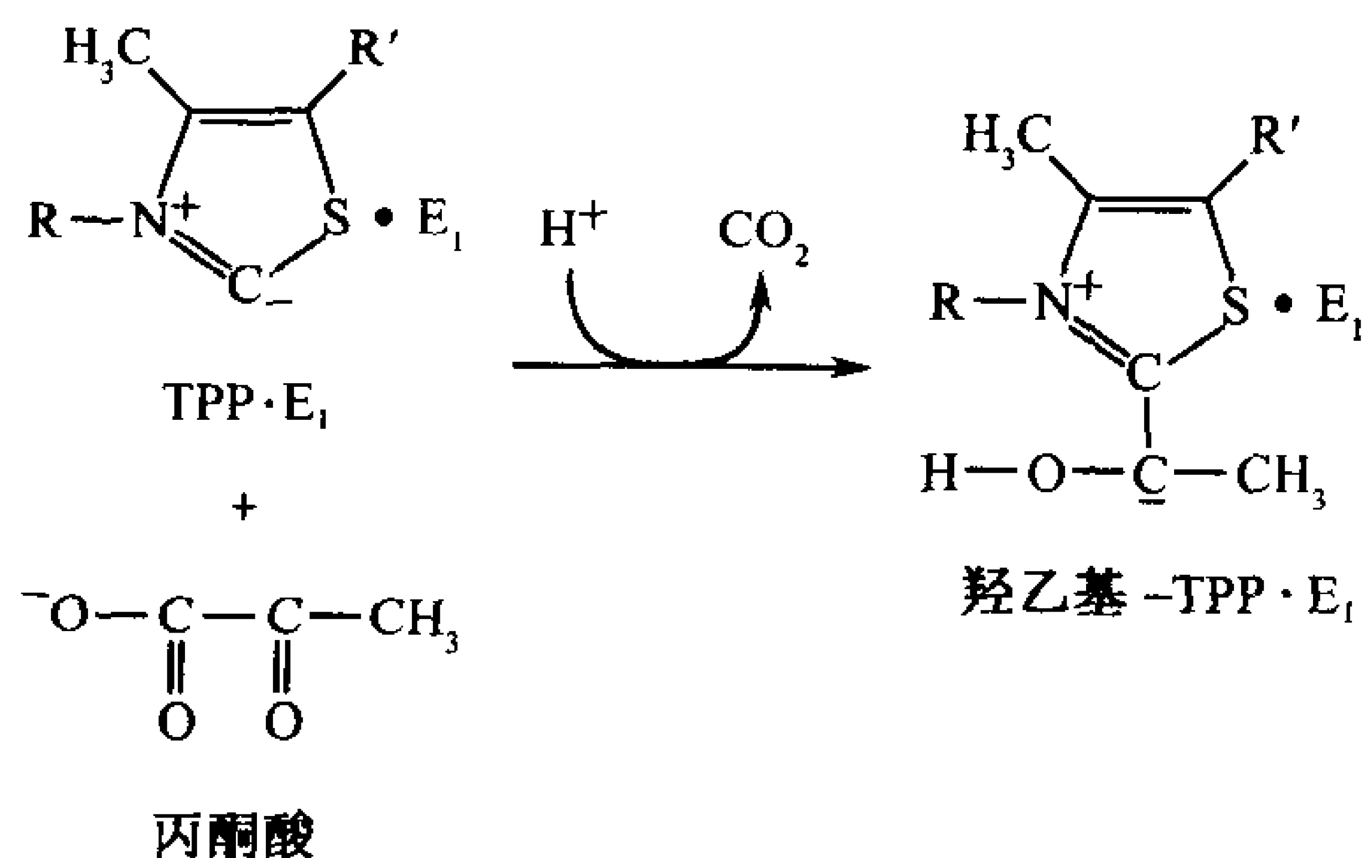


图 16-5 丙酮酸脱氢酶多酶复合物的 5 步反应

E_1(丙酮酸脱氢酶)包含 TPP,它催化反应 1 和 2。E_2(二氢硫辛酸转乙酰基酶)包含硫辛酰胺,它催化反应 3。E_3(二氢硫辛酸脱氢酶)包含 FAD 和氧化还原活性的二硫化物,它催化反应 4 和 5。

472 1) 丙酮酸脱氢酶(E_1)是一个需要 TPP 的酶,它催化丙酮酸脱羧,生成羟乙基-TPP 中间物。这个反应与酵母丙酮酸脱氢酶(见节 14-3B)催化的反应相同。



2) 羟乙基被转移到下一个酶,即含有硫辛酰胺基团的二氢硫辛酸转乙酰基酶(E_2)。硫辛酰胺是由**硫辛酸**(lipoic acid)通过一个酰胺键连接到赖氨酸残基的 ε-氨基上而组成(图 16-6)。硫辛酰胺的反应中心是一个环状的二硫化合物,它能可逆地还原生成**二氢硫辛酰胺**(dihydrolipoamide)。从丙酮酸衍生而来的羟乙基攻击硫辛酰胺的二硫基,TPP 被释放。因此当硫辛酰胺的二硫基被还原时,羟乙基负碳离子被氧化成乙酰基。

473

474 3) 接着 E_2 催化一个转酯化反应,即将乙酰基转到 CoA 上,产生乙酰 CoA 和二氢硫辛酰胺-E_2。

4) 现在已经形成了乙酰 CoA,但是 E_2 的硫辛酰胺基必须要再生。二氢硫辛酸脱氢酶(E_3)重新氧化二氢硫辛酰胺,完成 E_2 的催化循环。氧化型的 E_3 包含一个具有活性的 Cys—Cys 二硫基和紧密结合的 FAD。二氢硫辛酰胺的氧化,是一个二硫基交换反应。

5) 最后,还原型的 E_3 被再氧化。巯基被 FAD 重新氧化,形成的 $FADH_2$ 又被 NAD^+ 氧化,

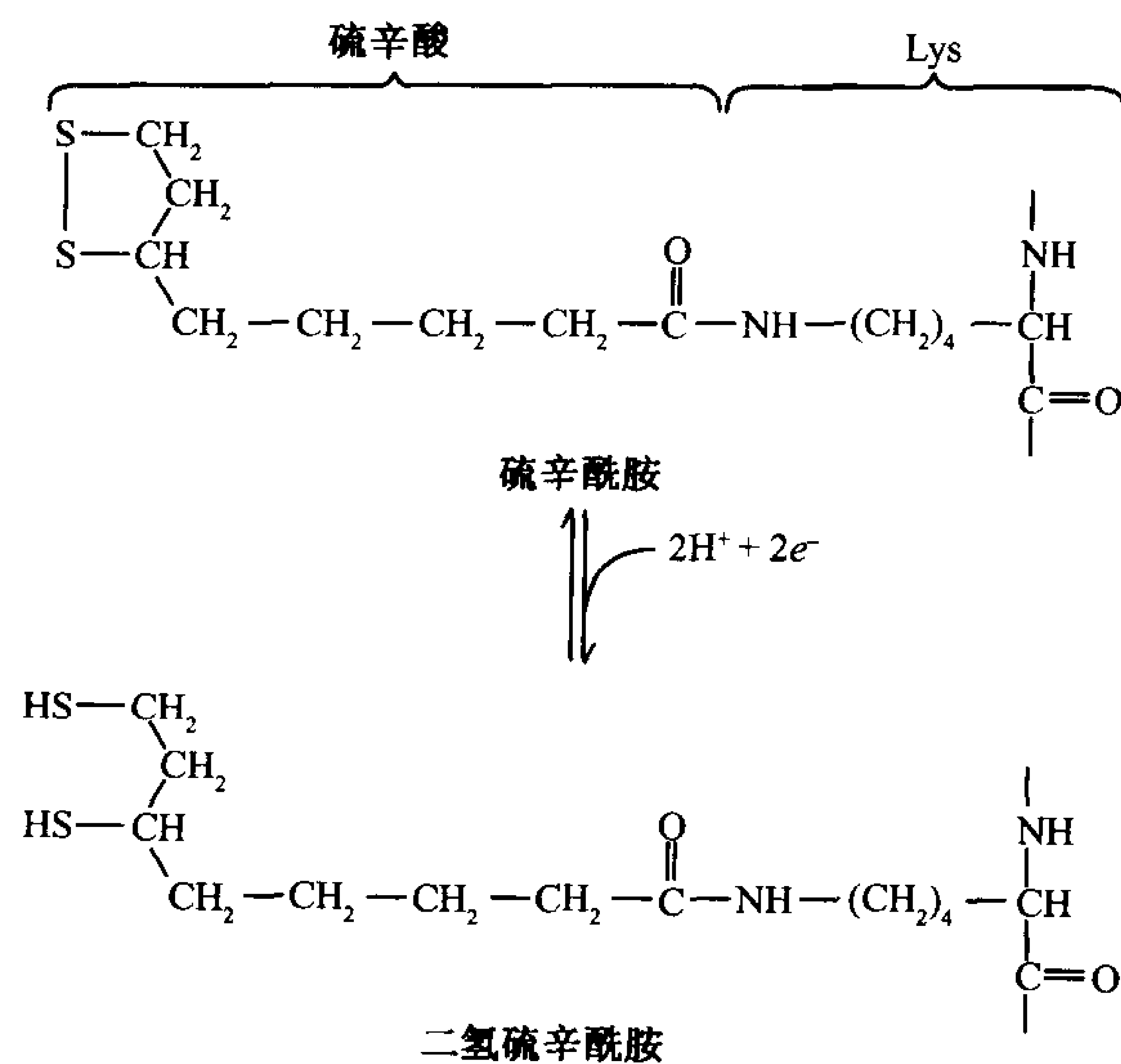
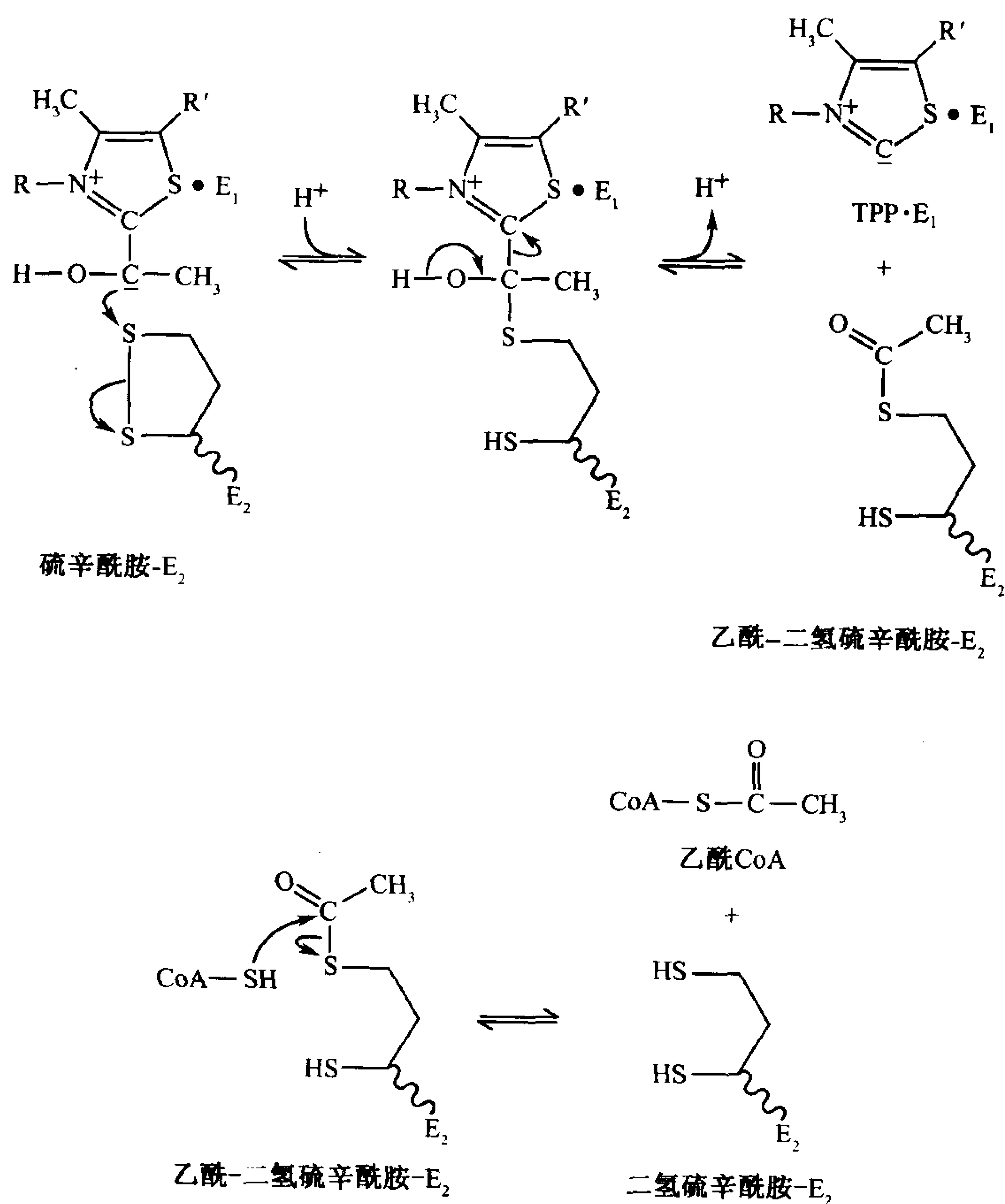
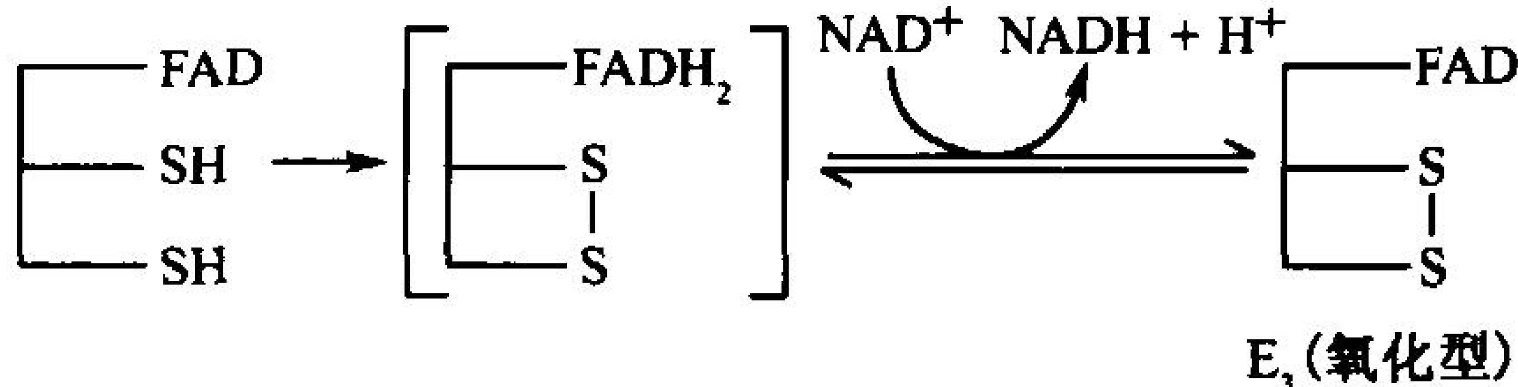


图 16-6　硫辛酰胺和二氢硫辛酰胺的相互转变

硫辛酸通过酰胺键共价结合到赖氨酸残基的 ε-氨基上，组成硫辛酰胺。



FAD
S
S
E_3(氧化型)
HS
HS
E_2
FAD
SH
SH
E_3(还原型)
S
S
E_2

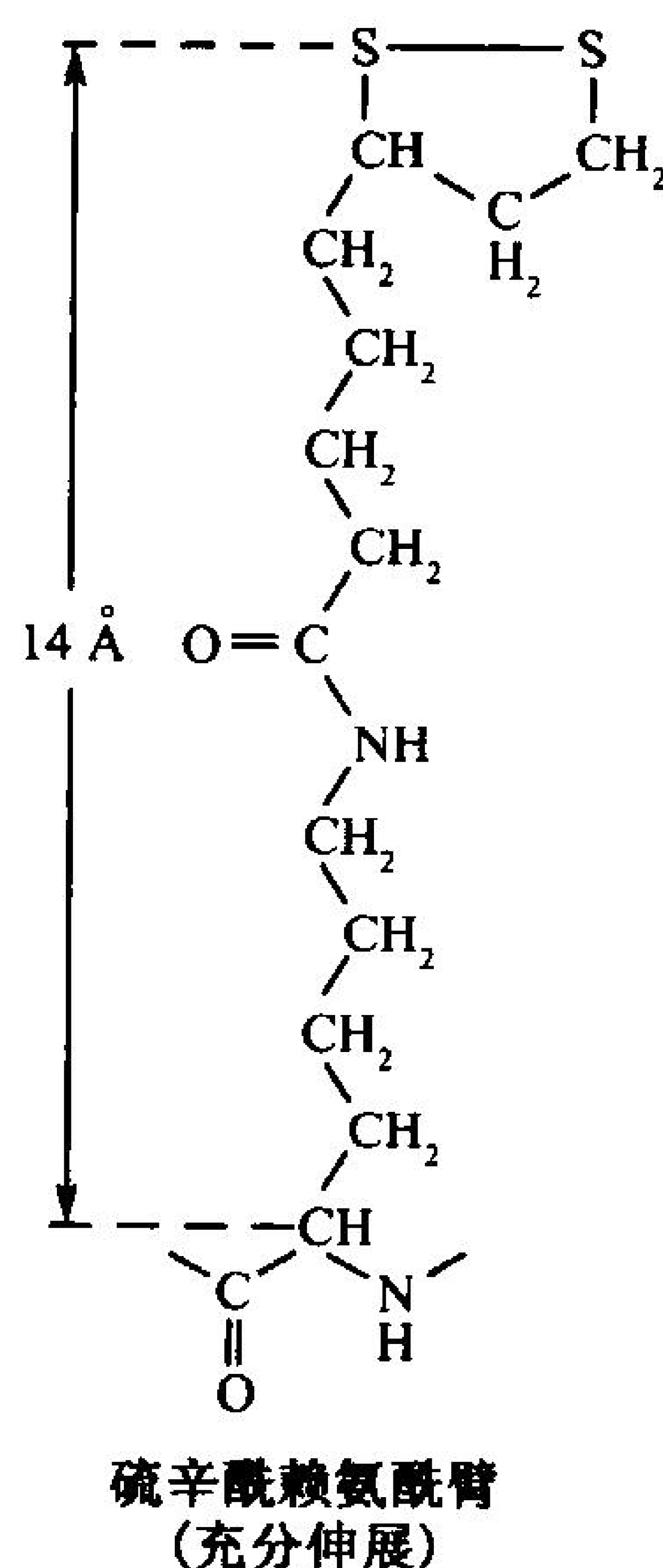


产生 NADH。

反应中间物是如何在 E_2(丙酮酸脱氢酶复合物的核心)和外面的 E_1 以及 E_3 蛋白质之间沟通的？关键是 E_2 的硫辛酰胺基团。硫辛酸残基和它附着在赖氨酸残基的侧链共长约 14Å。这个**硫辛酰赖氨酰臂**(lipoyllysyl arm,见右下图)显然就像一根长链,它将二硫基从 E_1(在那里它获得羟乙基)摆动到 E_2 的活性中心(在那里羟乙基被转移形成乙酰 CoA),然后再从那里摆动到 E_3(在那里还原的二硫基重新被氧化)。E_2 携带硫辛酰赖氨酰臂的结构域,通过富含脯氨酸和丙氨酸的柔性铰链连接到 E_2 蛋白质的其余部分。因为柔性和到达硫辛酰赖氨酰臂,一个 E_1 蛋白质能乙酰化许多 E_2 蛋白质,而一个 E_3 蛋白质也能重新氧化许多二氢硫辛酰胺基团。

图 16-7 棕色固氮菌二氢硫辛酸转乙酰基酶(E_2)催化域的 X 射线结构

每个残基用球表示。24 个蛋白质以 8 个三聚体的形式排列在立方体的角上(仅可见到复合物的前面一半)。立方体的边长约 125Å。底物和辅因子处于 E_2 蛋白质和立方体内部之间的空间中正合适。(引自 Wim Hol and Andrea Mattevi, University of Washington)



硫辛酰赖氨酰臂
(充分伸展)

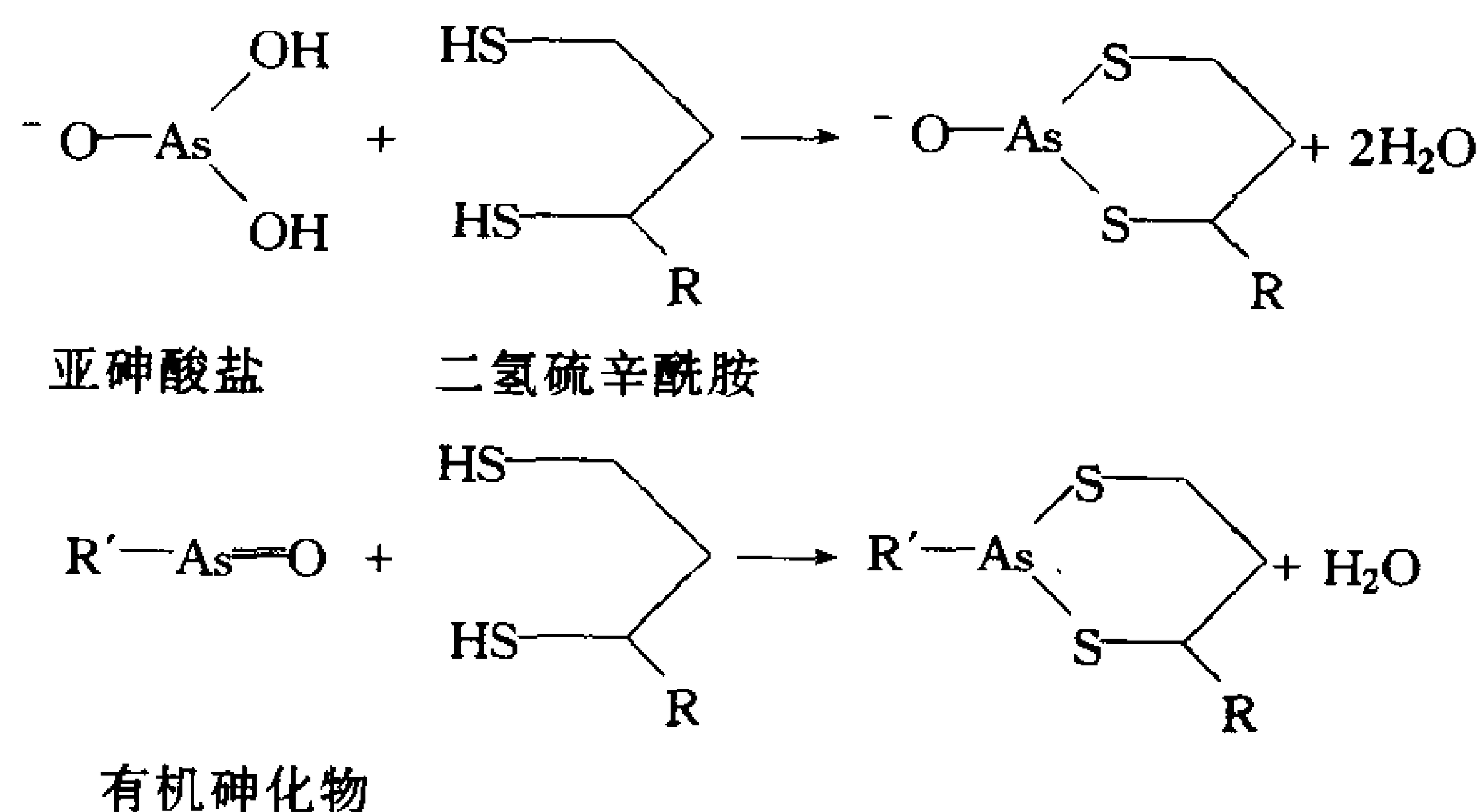
来自棕色固氮菌(*Azotobacter vinelandii*)E_2 催化域的 X 射线结构与电子显微镜观察相一致(图 16-3b),它显示 24 个 E_2 蛋白质以三聚体的形式排列在丙酮酸脱氢酶立方体核心的角上(图 16-7)。该核心含有足够大的通道,允许底物自由扩散。事实上,CoA 必须从立方体的里面接近

它的结合部位。硫辛酰赖氨酰臂可能伸入 E_2 核心的洞穴内部，并各处摆动以便"访问"E_1、E_2 和 E_3 的活性部位。完整的丙酮酸脱氢酶复合物能通过硫辛酰胺基与某些含砷化合物反应而失活（见框 16-1）。 475

框 16-1　健康和疾病的生物化学

砷中毒

自古以来人们就知道砷的毒性。三价砷化合物如亚砷酸盐（AsO_3^{3-}）和有机砷化物都是有毒的，因为它们结合到巯基化合物上（包括硫辛酰胺），形成双齿状加合物。



亚砷酸盐可使含硫辛酰胺的酶，特别是丙酮酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶复合物失活，从而使呼吸停止。然而有机砷化物对微生物的毒性比对人的毒性更大，显然，这是因为各自的酶对这些化合物的敏感性不同。不同毒性，是 20 世纪早期利用有机砷化物治疗梅毒（一种细菌性疾病）和锥虫病（一种寄生虫病）的基础。实际上，这些化合物是第一代抗生素，不必奇怪，虽然它们会产生严重的副作用。

砷时常被怀疑为导致夭折的毒物。长期以来，人们怀疑拿破仑（Napoleon Bonaparte）流放在 St. Helena 岛上时死于砷中毒，最近发现他的一绺头发含有高水平的砷，这强烈地支持了这一猜疑。但是，是谋杀还是环境污染？当时含砷的染料用于墙纸中，最后确定在潮湿的气候下，真菌将砷转变为易挥发的化合物。事实上，拿破仑房间的墙纸中确实含有砷，因此拿破仑的砷中毒可能并非是故意的。

达尔文（Charles Darwin）可能也是长期砷中毒的不知不觉的受害者。他在 Beagle 长期航海，以后的许多年中被湿疹、头晕、头痛、痛风和恶心所折磨，这些都是砷中毒的症状。亚砷酸钾溶液（Fowler 氏溶液）是 19 世纪广泛使用的"补药"，每毫升含 10mg 亚砷酸盐。许多人，包括达尔文本人，可能服用这药很多年。

3. 柠檬酸循环的酶

在这一节中，我们要讨论柠檬酸循环的 8 种酶。对每一种酶机制的阐明是大量实验工作的结果，虽然如此，但有关酶的一些详细作用机制和它们的调控性质的问题仍未解决。

A. 柠檬酸合酶

柠檬酸合酶（citrate synthase）催化乙酰 CoA 和草酰乙酸的缩合。柠檬酸循环的起始反应是碳原子（来自糖、脂肪酸和氨基酸）以乙酰 CoA 形式"进入熔炉"。柠檬酸合酶的反应是一个有序的顺序动力学机制，在该机制中，草酰乙酸和酶的结合是在乙酰 CoA 之前。

X 射线研究表明，游离的酶（二聚体）是"开放"型，具有形成缝隙的两个结构域，该缝隙包含 476

草酰乙酸的结合位点(图 16-8a)。当和草酰乙酸结合时,较小的结构域发生了明显的18°的旋转,从而关闭了缝隙(图 16-8b)。"开放"型和"关闭"型的存在解释了酶的有序顺序动力学行为。构象的变化产生了乙酰 CoA 的结合位点,并封闭了草酰乙酸的结合位点,因此溶剂不能到达已结合的底物处。

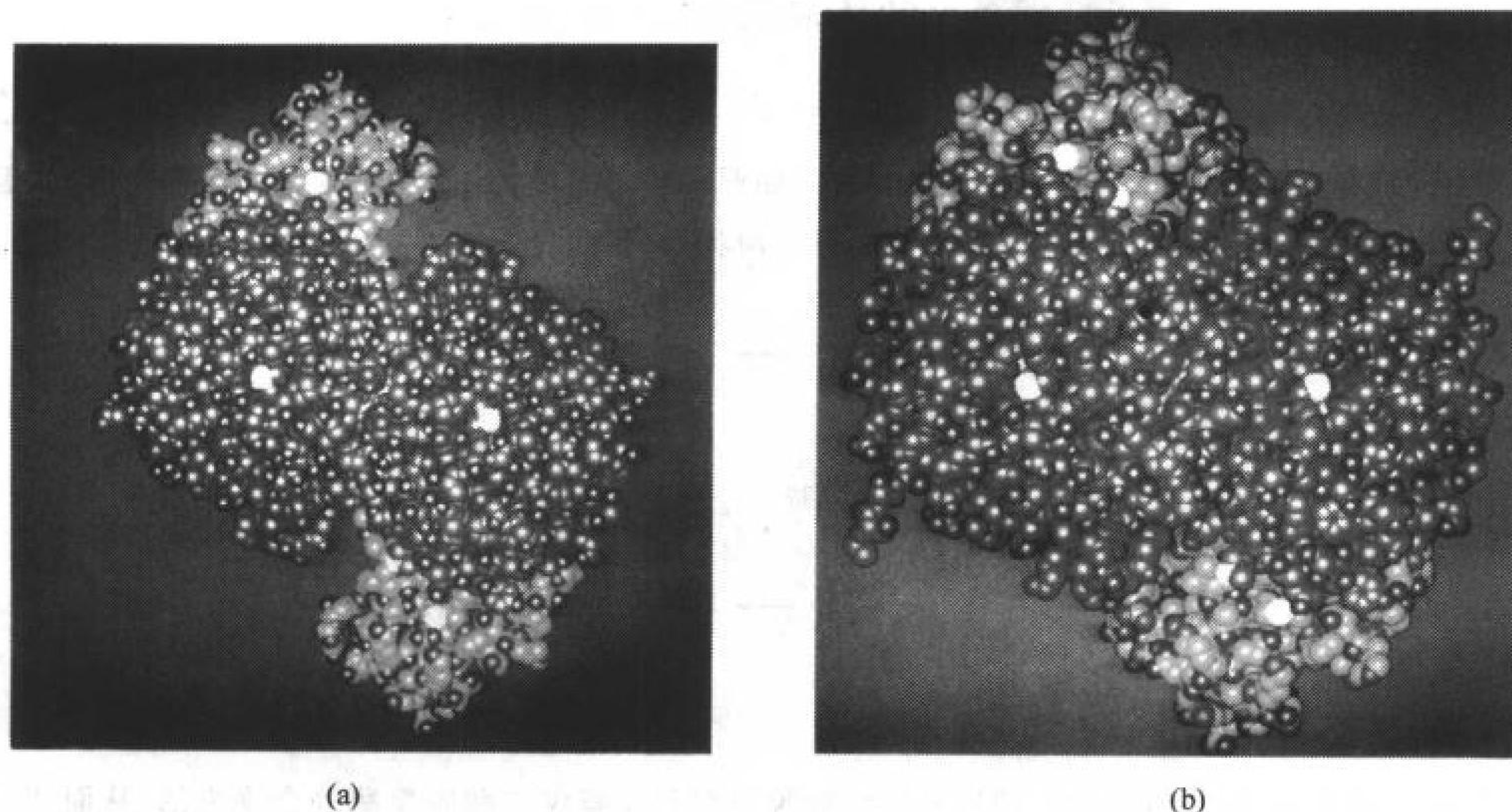


图 16-8 柠檬酸合酶的构象变化

(a)开放构象。(b)关闭的底物结合构象。在酶的每个亚基中,小结构域的碳原子为绿色,大结构域的碳原子为洋红色。两个结构域内的氮原子、氧原子和硫原子分别为蓝色、红色和黄色。开放型和关闭型之间大的构象变化,原子间的相对移动需达到 15Å。(引自 Anne Dallas, University of Pennsylvania; and Helen Berman, Fox Chase Cancer Center 及 James Remington and Robert Huber, Max-Planck-Institut für Biochemie, Germany 测定的 X 射线结构)

在 James Remington 提出的反应机制中,柠檬酸合酶的 3 个离子化侧链参与催化(图 16-9)。

1) 当第 375 位的天冬氨酸(作为碱)从甲基上移去一个质子,第 274 位的组氨酸(作为酸)质子化烯醇式氧时,烯醇化乙酰 CoA 在反应的限速步骤中产生。

2) **柠檬酰 CoA** 在第二个酸-碱协同催化步骤中形成。在这步反应中,乙酰 CoA 的烯醇基(一个亲核体)攻击草酰乙酸,第 274 位的组氨酸夺回先前给出的质子,第 320 位的组氨酸(作为酸)送一个质子给草酰乙酸的羰基。柠檬酰 CoA 中间物仍结合在酶上。柠檬酸合酶是在没有金属离子辅因子的帮助下能直接生成 C—C 键的少数酶中的一个。

3) 柠檬酰 CoA 水解成柠檬酸和 CoA。这种水解作用提供反应的热力学推动力($\Delta G^{\circ\prime} = -31.5 \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)。以后我们就会明白,为什么反应从表面上看是浪费燃料的、需要如此大的自由能。

B. 顺乌头酸酶

顺乌头酸酶(aconitase)催化以**顺乌头酸**(cis-aconitate)为中间物的柠檬酸和**异柠檬酸**(isocitrate)的可逆性异构化作用。反应从脱水步骤开始,在这脱水步骤中 H^+ 和 OH^- 基团被移去。因为柠檬酸的中心碳原子上有 2 个羧甲基取代基,因此它是前手性的,而不是手性的。虽然可以想

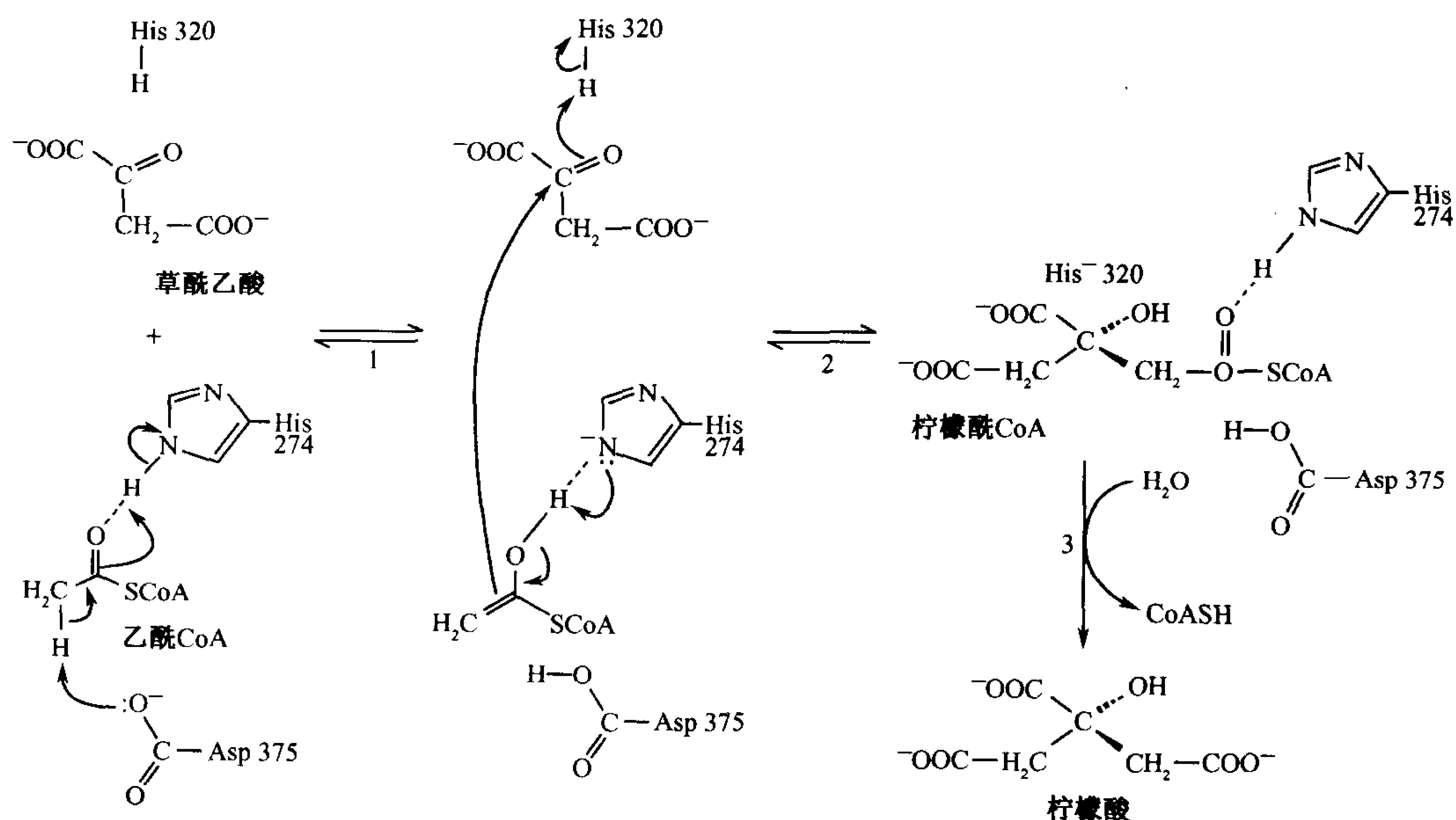
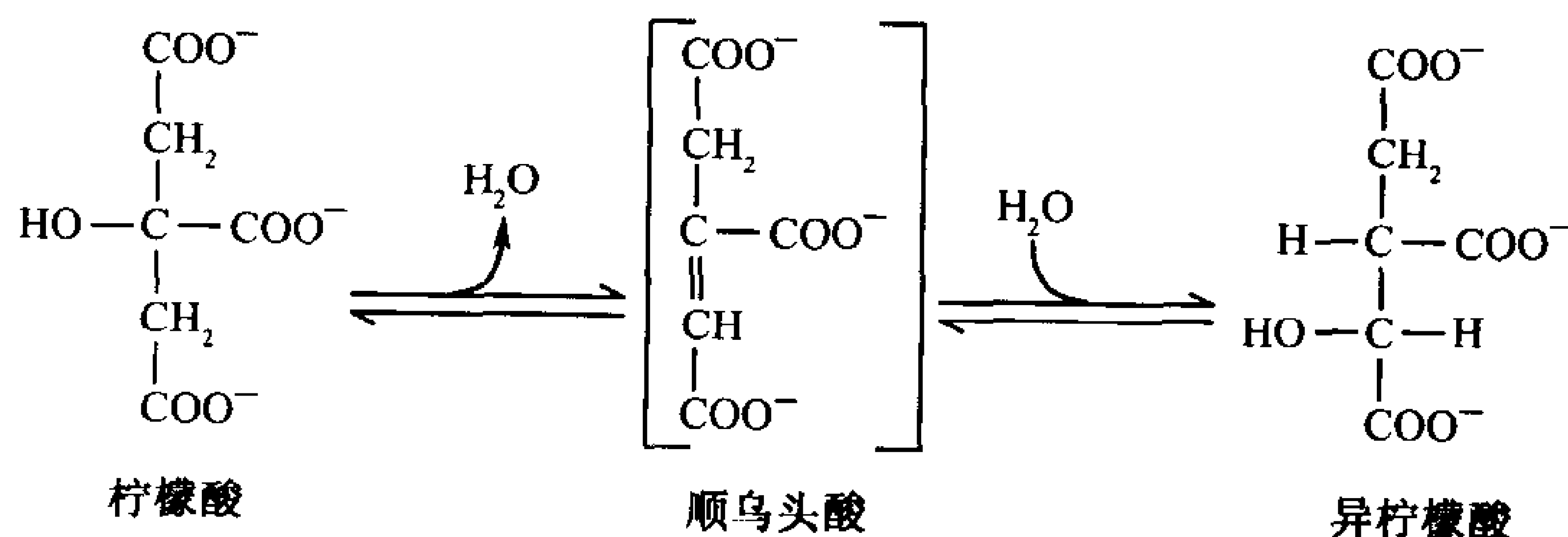


图 16-9　柠檬酸合酶的反应机制

中性形式的第 274 位的 His 和第 320 位的 His，以及第 375 位的 Asp 参与了广义酸碱催化。限速步骤是烯醇化乙酰 CoA 的生成，烯醇化乙酰 CoA 通过连接到第 274 位 His 阴离子的氢键所稳定。然后乙酰 CoA 的烯醇基亲核攻击草酰乙酸的羰基碳。生成的中间物——柠檬酰 CoA 被水解产生柠檬酸和 CoA。[引自 Remington, J. S., Curr. Opin. Struct. Biol. 2, 732(1992)]



象水从 2 个羧甲基臂中的任何一个除去，但顺乌头酶仅仅从柠檬酸的下臂(Pro-R)(也就是产物分子有 R 构型的臂；见框 4-1)移去水。

顺乌头酸酶含有**[4Fe-4S]铁-硫簇**(一个 4 个铁原子和 4 个硫原子的排列)，该铁-硫簇可能和柠檬酸的 OH 基配位，以利于它的移去。铁-硫簇通常参与氧化还原过程(见节 17-2c)，但顺乌头酸酶是一个微妙的例外。

顺乌头酸酶反应的第二个步骤是顺乌头酸双键的重新水合形成异柠檬酸。虽然顺乌头酸双键的加水可能产生 4 种立体异构体，但是顺乌头酸酶催化立体专一的加 OH^- 和 H^+，仅仅生成一种异柠檬酸的立体异构体。

C. 依赖于 NAD^+ 的异柠檬酸脱氢酶

异柠檬酸脱氢酶(isocitrate dehydrogenase)催化异柠檬酸的氧化脱羧，生成 α-酮戊二酸。这

步反应产生柠檬酸循环的第一个 CO_2 和 NADH。注意，这个 CO_2 来源于柠檬酸循环的起始物草酰乙酸，而不是来自乙酰 CoA(图 16-2)。(哺乳动物组织还含有一种异柠檬酸脱氢酶同工酶，它利用 $NADP^+$ 作为辅因子。)

依赖于 NAD^+ 的异柠檬酸脱氢酶还需要 Mn^{2+} 或 Mg^{2+} 作辅因子，该酶催化仲醇(异柠檬酸)氧化成酮(**草酰琥珀酸**, oxalosuccinate)，接着通过 β-羧基的脱羧作用生成酮(图 16-10)。Mn^{2+} 帮助极化新形成的羰基。异柠檬酸脱氢酶的反应机理类似于磷酸戊糖途径中的磷酸葡萄糖脱氢酶(见节 14-6A)。

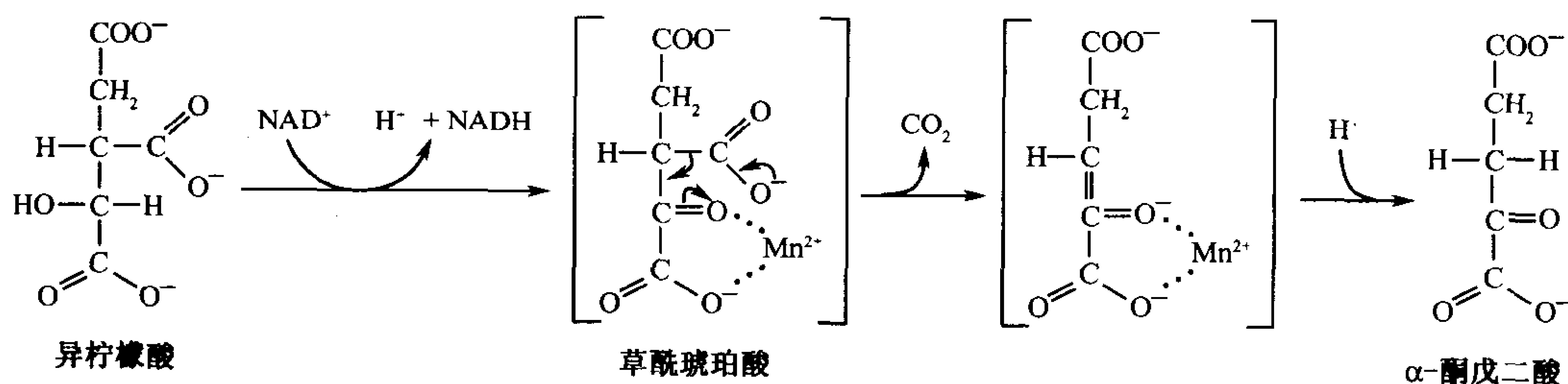


图 16-10 异柠檬酸脱氢酶的反应机理

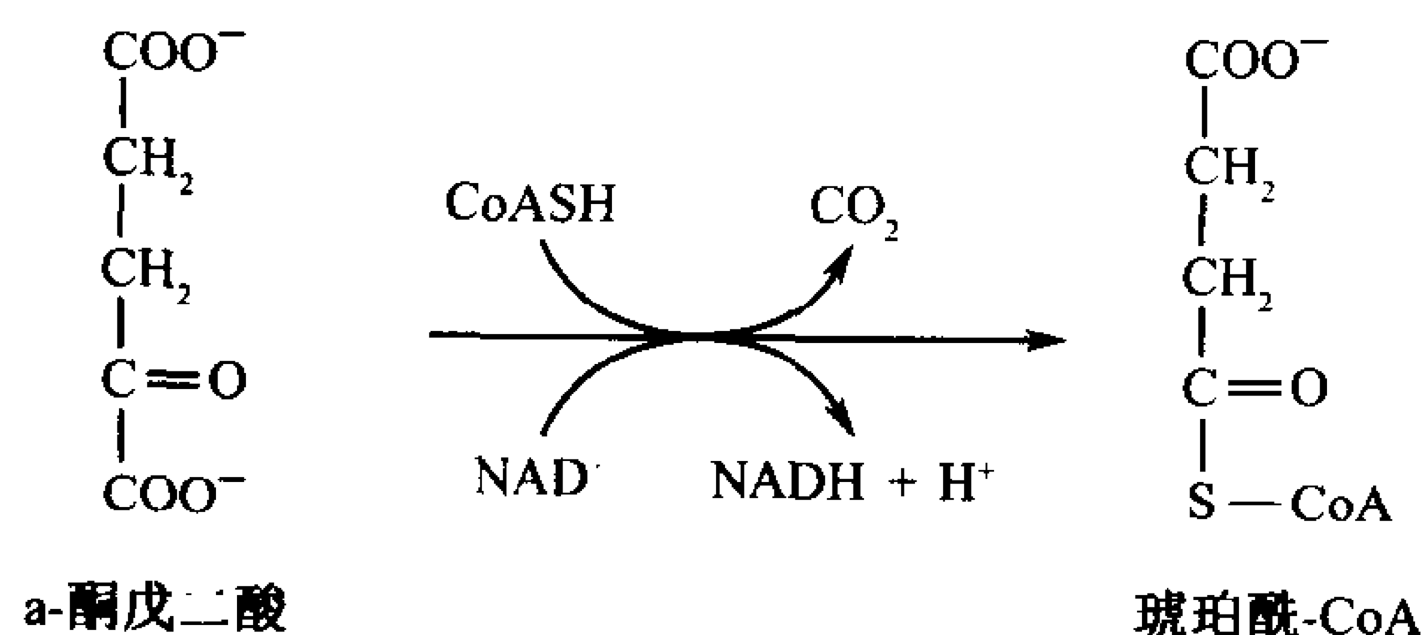
草酰琥珀酸用方括号表示，因为它并不从酶上解离。

478

异柠檬酸脱氢酶反应的中间产物草酰琥珀酸，仅暂短存在，因此它的存在很难证实。然而通过突变重要的催化残基，即第 160 位的酪氨酸和第 230 位的赖氨酸，制造一个动力学“瓶颈”，就能使酶反应慢下来，因此反应中间物就积累。突变的异柠檬酸脱氢酶晶体接触底物异柠檬酸，通过 X 射线晶体学可以可视化，这是利用最近发展的快速 X 射线强度测定技术实现的，该技术需要通过同步加速器产生高强度的 X 射线。这些研究揭示，草酰琥珀酸中间物存在于酶的活性中心中。

D. α-酮戊二酸脱氢酶

α-酮戊二酸脱氢酶(α-ketoglutarate dehydrogenase)催化 α-酮酸(α-酮戊二酸)的氧化脱羧。这个反应产生柠檬酸循环的第二个 CO_2 和 NADH。这个 CO_2 仍然来源于草酰乙酸，而不是乙酰-CoA(图 16-2)。因此，虽然每轮柠檬酸循环氧化 2 个碳原子成 CO_2，但是进入乙酰基的碳原子，直到后续几轮循环才被氧化成 CO_2。



α-酮戊二酸脱氢酶反应，化学上十分类似于丙酮酸脱氢酶多酶复合物催化的反应。α-酮戊二酸脱氢酶是一个多酶复合物，它包括 **α-酮戊二酸脱氢酶**(E_1)、**二氢硫辛酸转琥珀酰酶**(E_2)和

二氢硫辛酸脱氢酶(E_3)。确实,这个 E_3 与丙酮酸脱氢酶复合物的 E_3 是相同的(多酶复合物的 **2-酮酸脱氢酶**家族的第 3 个成员是**支链 α-酮酸脱氢酶**,该脱氢酶参与异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸的降解;见节 20-4D)。α-酮戊二酸脱氢酶复合物催化的反应,以和丙酮酸脱氢酶复合物中的那些反应相同的机制进行。在这情况下,产物仍是高能硫酯化合物,即**琥珀酰 CoA**。

E. 琥珀酰 CoA 合成酶

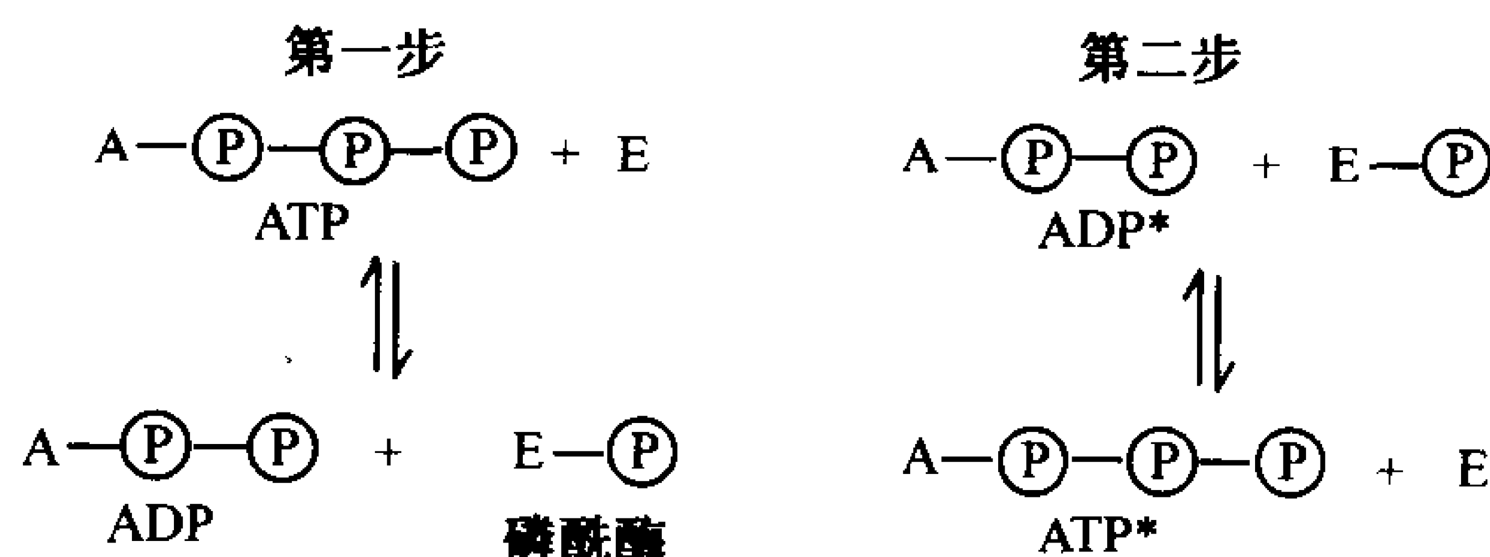
琥珀酰 CoA 合成酶[succinyl-CoA synthetase,也称**琥珀酸硫激酶**(succinate thiokinase)]将高能琥珀酰 CoA 裂解,与高能核苷三磷酸的合成相偶联(酶的两个名称是指其逆反应)。哺乳动物的酶通常从 GDP + P_i 合成 GTP;而植物和微生物的酶则利用 ADP + P_i 合成 ATP。不过这些反应能量上是等价的,因为 ATP 和 GTP 通过核苷二磷酸激酶很快地互相转变(见节 13-2C):



$$\mathrm{GTP + ADP \rightleftharpoons GDP + ATP} \quad \Delta G^{\circ\prime} = 0$$

琥珀酰 CoA 合成酶怎样将放能的琥珀酰 CoA($\Delta G^{\circ\prime} = -32.6\mathrm{kJ \cdot mol^{-1}}$)裂解反应与从相应的核苷二磷酸和 P_i 生成核苷三磷酸($\Delta G^{\circ\prime} = 30.5\mathrm{kJ \cdot mol^{-1}}$)的吸能反应偶联起来?这个问题可通过同位素标记 ADP 的实验来回答。在缺乏琥珀酰 CoA 的情况下,菠菜酶催化 ATP 的 γ-磷酸基转移到[^{14}C]ADP 上,产生[^{14}C]ATP。这种同位素交换反应说明有一个磷酰化酶中间物的参与,它介导了这两步反应:

479



这一信息导致人们分离动力学上有活性的磷酰化酶,在该酶中磷酸基团是共价连接到组氨酸残基的 N3 位上。琥珀酰 CoA 合成酶的三步反应机制如图 16-11 所示。

1) 琥珀酰 CoA 和 P_i 反应,生成**琥珀酰磷酸**(succinyl-phosphate)和 CoA。

2) 然后磷酸基从琥珀酰磷酸转移到酶的组氨酸残基上,并释放琥珀酸。

3) 酶上的磷酸基转给 GDP 生成 GTP。

480

注意这些步骤中的每一步,*琥珀酰 CoA 的能量通过形成高能化合物而被保存下来;这些高能化合物首先是琥珀酰磷酸,然后是 3-磷酸组氨酸残基,最后是 GTP*。这个过程使人联想起传递热土豆。

至此,在柠檬酸循环中,已有 1 个乙酰基被完全氧化成 2 个 CO_2,并产生了 2 个 NADH 和 1 个 GTP(与 1 个 ATP 相当)。为了完成循环,琥珀酸必须回到草酰乙酸,这由循环剩下的三步反应来完成。柠檬酸循环的反应和它们的立体专一性,已通过利用放射性示踪物的实验而被证实。

F. 琥珀酸脱氢酶

琥珀酸脱氢酶(succinate dehydrogenase)催化琥珀酸立体专一的脱氢,生成延胡索酸。

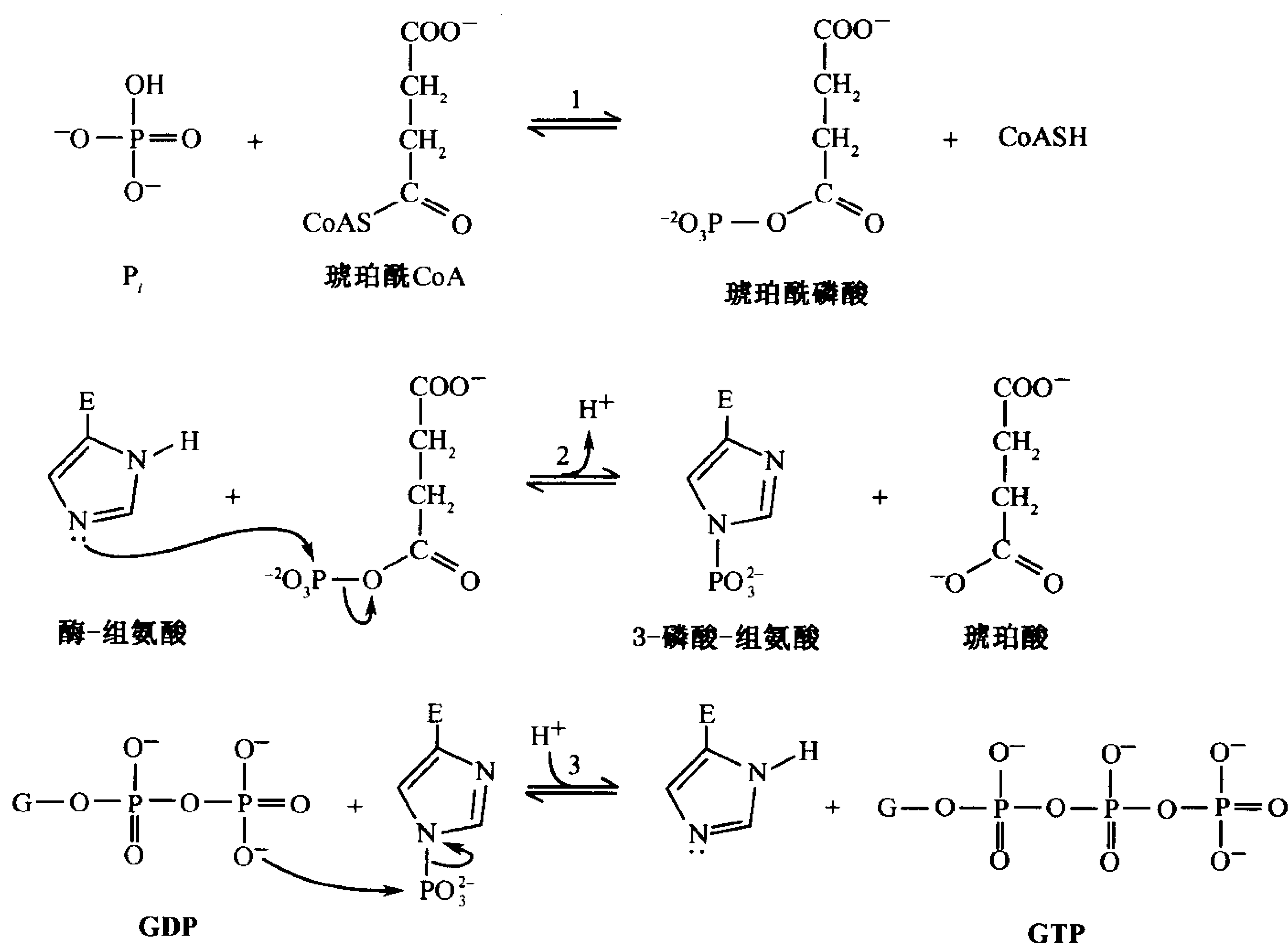
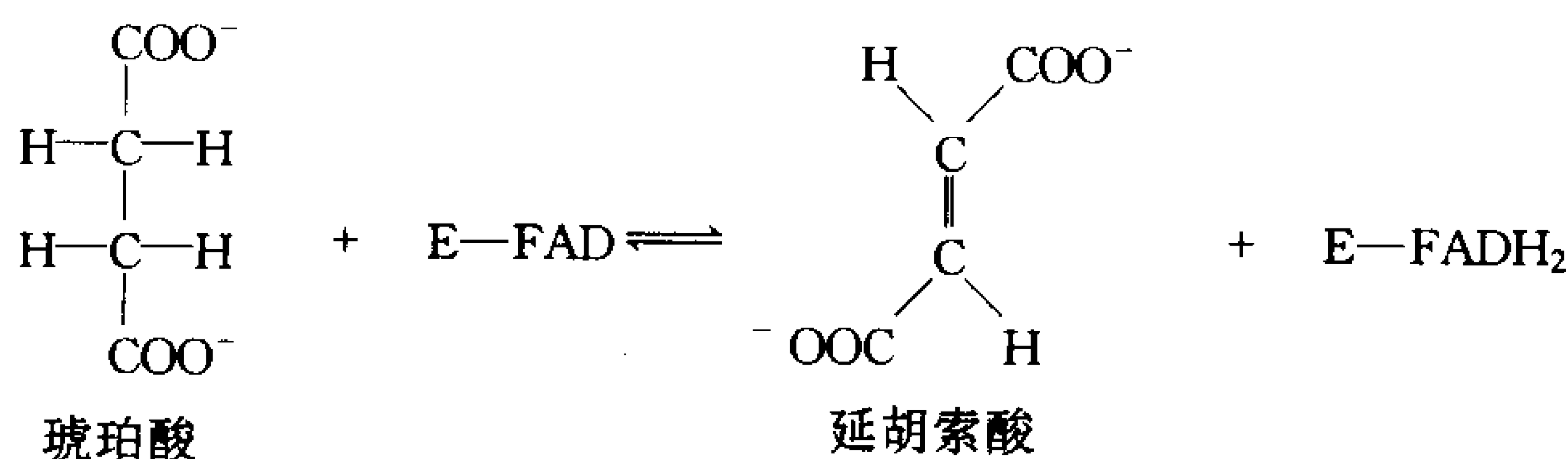
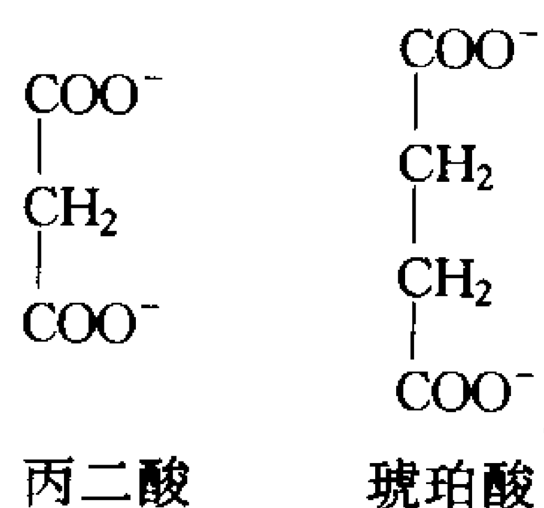


图 16-11 琥珀酰 CoA 合成酶催化的反应

(1)高能混合酸酐——琥珀酰磷酸的形成。(2)高能中间物——磷酸组氨酸的形成。(3)转移磷酸基到 GDP 上,形成 GTP。





琥珀酸脱氢酶被丙二酸(如左边所示)强烈抑制,丙二酸是琥珀酸的结构类似物,是竞争性抑制剂的典型例子。当 Krebs 提出他的柠檬酸循环理论时,丙二酸抑制细胞呼吸提供了一个线索,即琥珀酸在氧化底物中起催化作用,而不只是另外一个底物。

琥珀酸脱氢酶含辅基 FAD,FAD 通过一个组氨酸残基共价连接到酶上(图 16-12;在大多数其他含 FAD 的酶中,FAD 只是紧密地、但是非共价地结合到它的酶上)。

通常,FAD 在生化上的功能是将烷烃氧化(如琥珀酸)成烯烃(如延胡索酸),而 NAD^+ 参与放能较多的醇氧化成醛或酮。琥珀酸脱氢产生的 $FADH_2$,在琥珀酸脱氢酶能进行另一个催化循环前,必须重新氧化。$FADH_2$ 的重新氧化发生在线粒体的电子传递链中,关于电子传递链我们将在节 17-2 中比较详细地讨论。琥珀酸脱氢酶是柠檬酸循环中惟一的一个与膜结合的酶(其他的酶都是线粒体基质的组分),它直接将电子加入线粒体膜的电子传递机器中。在此过程中,

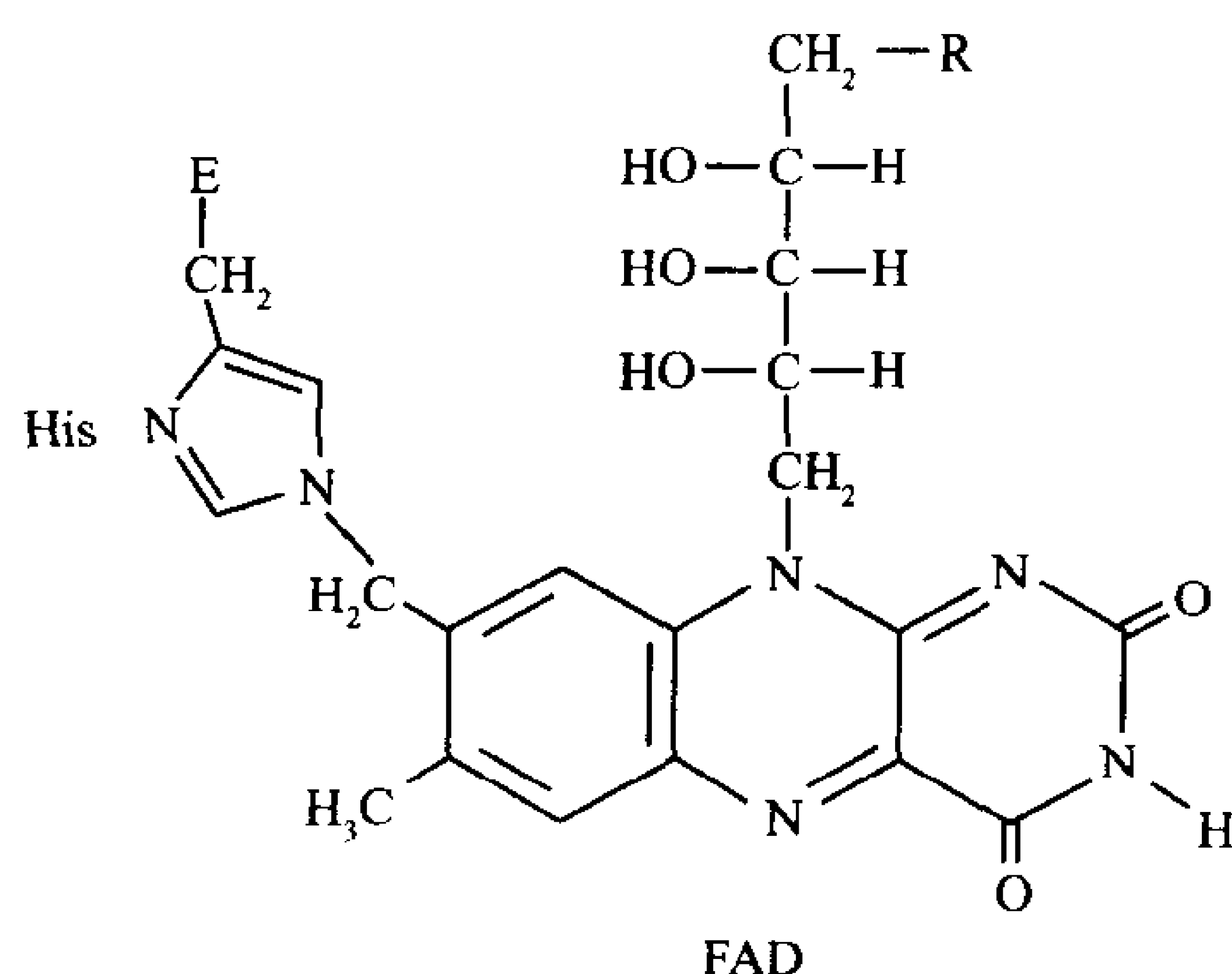


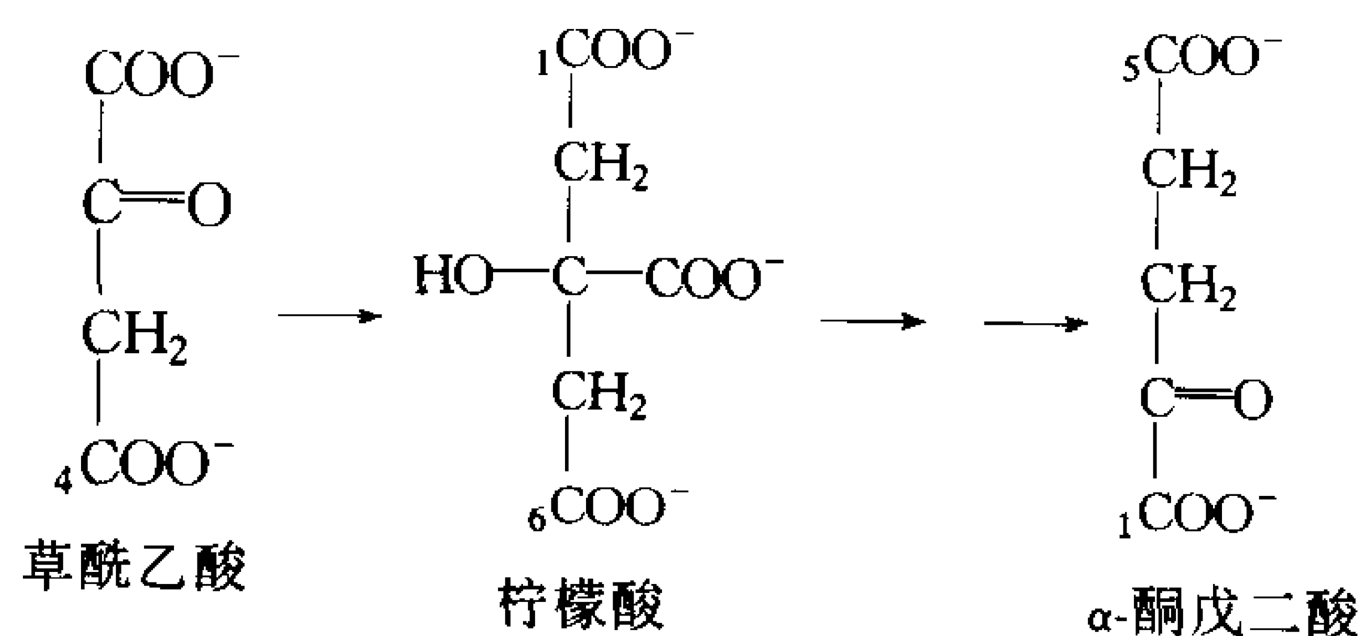
图 16-12　FAD 共价连接到琥珀酸脱氢酶的组氨酸残基上
R 代表 ADP 部分

$FADH_2$ 重新氧化成 FAD。

框 16-2　生物化学焦点

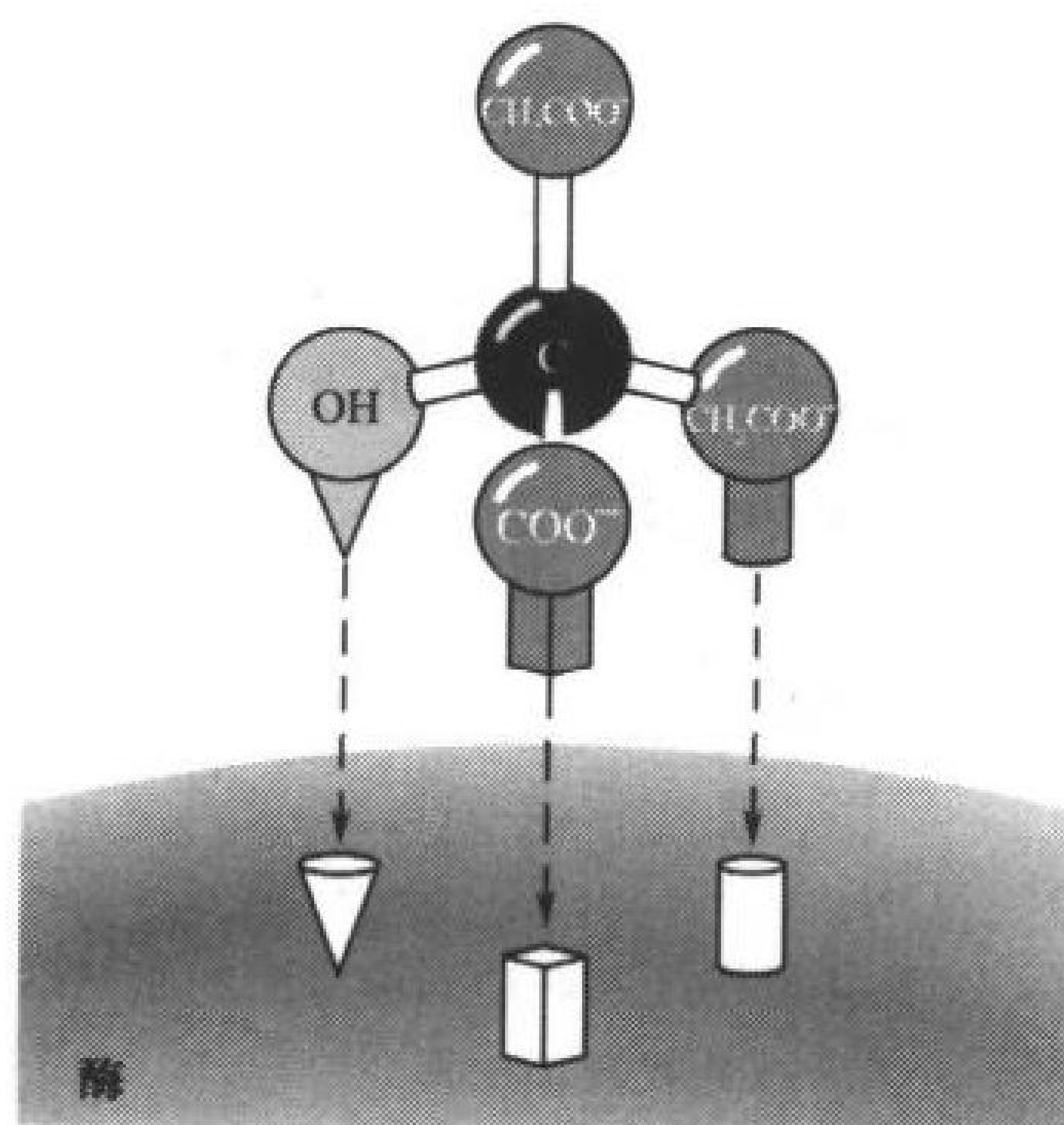
柠檬酸循环反应的立体专一性

在 20 世纪 30 年代后期和 40 年代早期，只有当 ^{11}C(半衰期 20min)和 ^{14}C(半衰期 5715 年)变得可被利用时，才有可能进行放射活性代谢物的实验。在那时，关于酶的前手性和立体专一性的概念了解甚少。例如，一般相信柠檬酸(有一个对称面)化学上相等的两半是难以区分的。因此假定，起初定位在草酰乙酸 C4 上的放射性混杂进入柠檬酸，导致此柠檬酸的 C1 和 C6 原子被相等地标记，结果生成的 α-酮戊二酸的 Cl 和 C5 两个原子上都带标记。

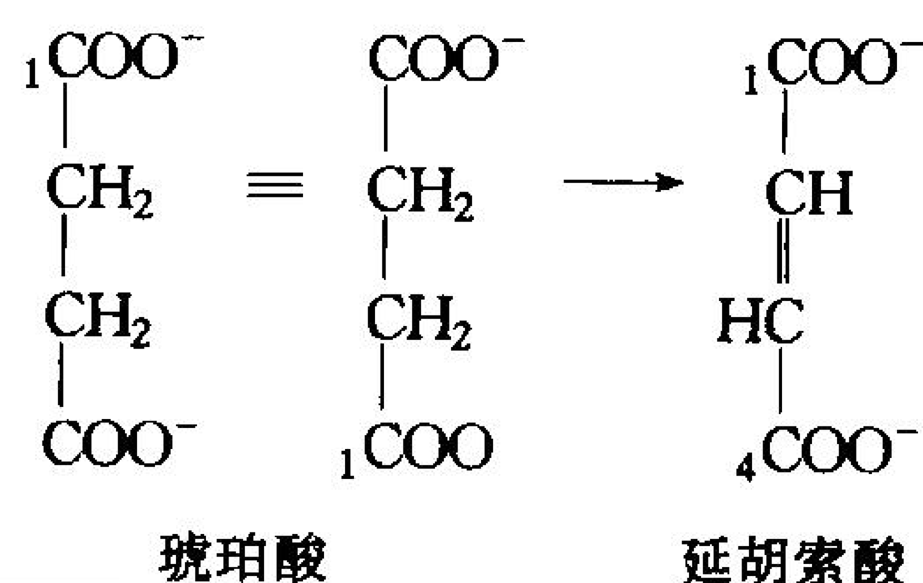


因此，只有 α-酮戊二酸的 C1 是放射活性的这一发现，对草酰乙酸和乙酰 CoA 的缩合产物的本质提出了怀疑。根据这一具有结论性的标记实验结果，柠檬酸分子怎么可能是对称的呢？这一疑问导致从“柠檬酸循环”(由 Krebs 提出)到“三羧酸(TCA)循环”这一名称的改变，因为三羧酸是循环的起始缩合物，三羧酸循环这个名称仍然存在。

现在已认识到柠檬酸是一个前手性分子，乌头酸酶能区分它的两个羧甲基基团。1948 年 Alexander ogston 指出，柠檬酸能通过三点附着，与顺乌头酸酶的表面不对称地相互作用。

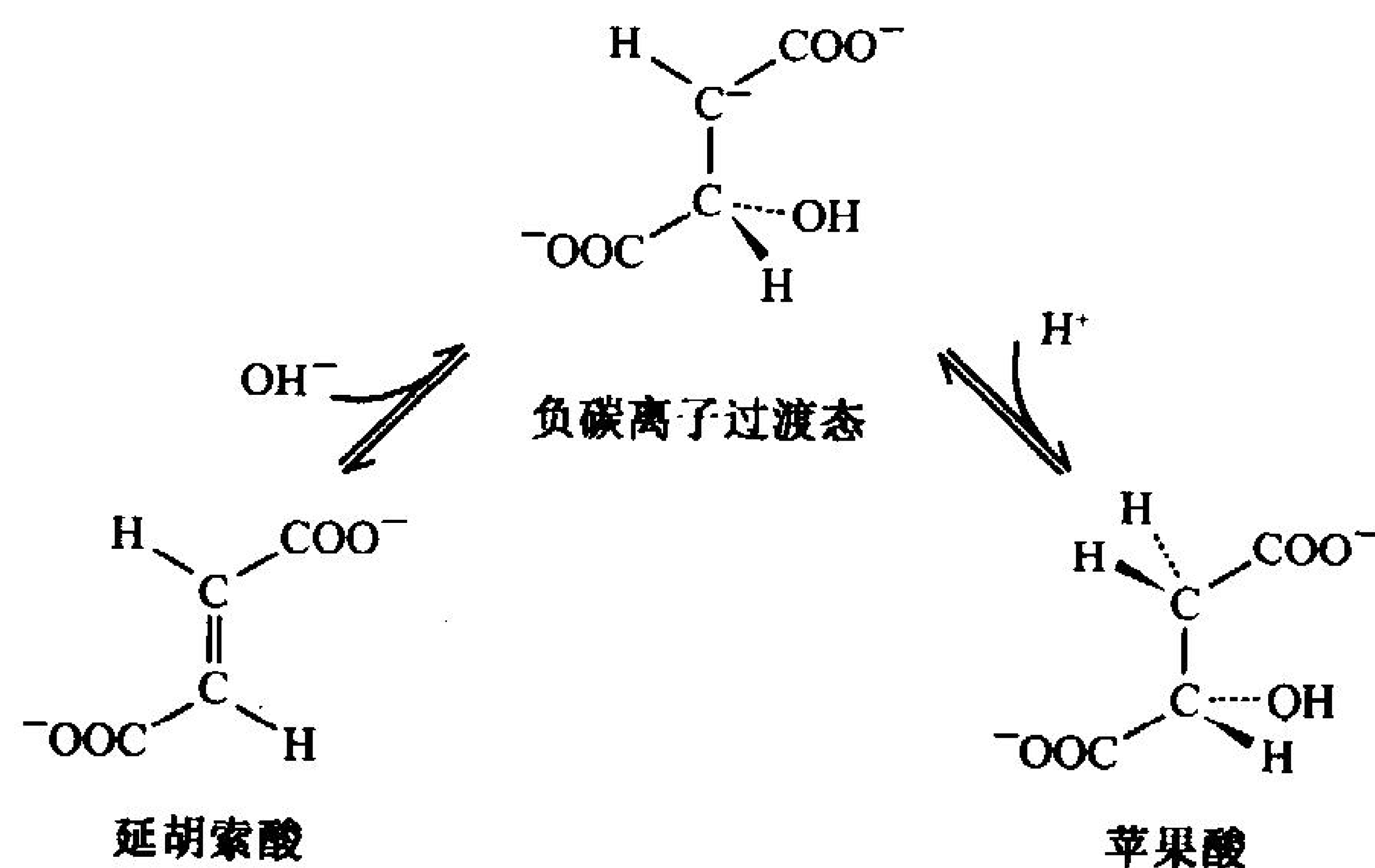


因为只有一种方式能结合底物，柠檬酸的两个—CH_2COO^-基团中的一个将参加反应，生成异柠檬酸。直到琥珀酰 CoA 合成酶催化反应后，草酰乙酸的标记原子最终才被混杂。产物琥珀酸是二重旋转对称的而不是前手性的，因此琥珀酰 CoA C1 的标记将出现在延胡索酸的 C1 和 C4。



482　## G. 延胡索酸酶

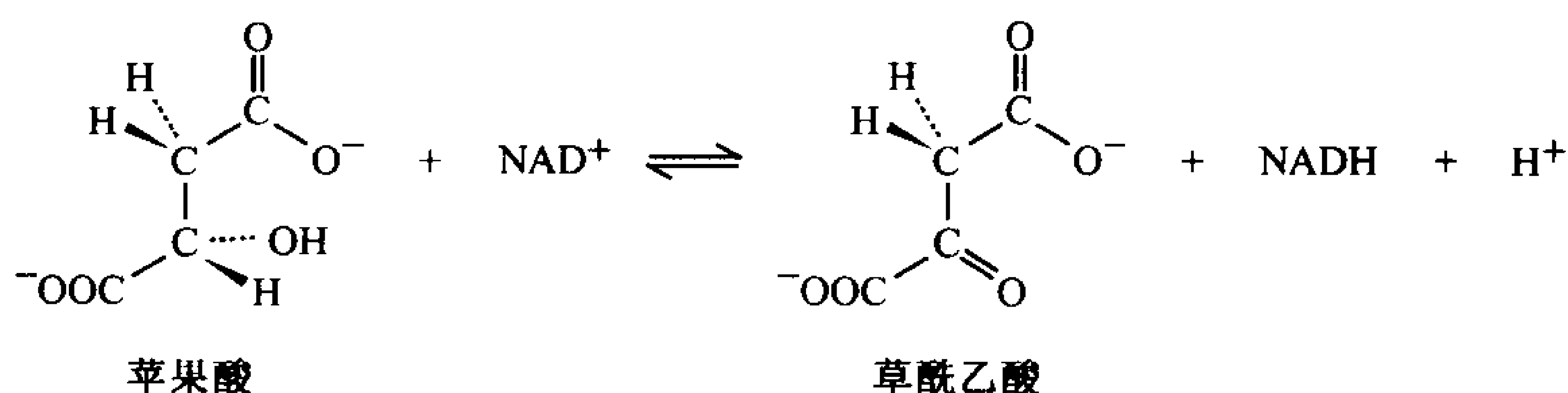
延胡索酸酶[fumarase，延胡索酸水合酶(fumarate hydratase)]催化延胡索酸双键的水合生成苹果酸。水合反应的进行要经过一个负碳离子的过渡态，OH^-的加入是在H^+加入之前。



H. 苹果酸脱氢酶

苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase)催化柠檬酸循环的最后一步反应，重新生成草酰乙酸。

苹果酸的羟基在一个依赖于 NAD^+ 的反应中被氧化。



氢负离子转运给 NAD^+ 的机制和乳酸脱氢酶以及醇脱氢酶中氢负离子的转运机制相同（见节14-3）。这 3 种酶的 NAD^+ 结合结构域的 X 射线晶体学比较指出，它们十分类似，这和所有 NAD^+ 结合结构域都来自共同祖先的假设是一致的。

苹果酸脱氢酶反应的 $\Delta G^{\circ\prime}$ 值为 $+29.7kJ \cdot mol^{-1}$，因此达到平衡（和在细胞条件下）时草酰乙酸的浓度相对于苹果酸来说是很低的。然而，请回忆一下，由于柠檬酰 CoA 硫酯键的断开，由柠檬酸合酶催化的反应，即柠檬酸循环的第一步反应是高度放能的（$\Delta G^{\circ\prime} = -31.5kJ \cdot mol^{-1}$）。现在我们就能理解这一看来似乎是浪费燃料的过程的必要性。即使在细胞内草酰乙酸的浓度很低时，这个过程也允许柠檬酸的生成（是放能的），从而有助于保持柠檬酸循环的运转。

4. 柠檬酸循环的调节

柠檬酸循环应细胞所需，产生能量的能力是严格调控的。底物的存在，柠檬酸循环中间物作为生物合成前体的需要，以及 ATP 的需求都影响循环的进行。有证据表明，柠檬酸循环中的酶，在物理上是相联系的，这可能有利于它们的协同调节（见框 16-3）。在我们讨论柠檬酸循环调节的各种机制之前，让我们简单地思考一下循环产生能量的能力。

483

氧化 1 个乙酰基为 2 分子 CO_2 是 4 个电子对过程（但要记住，并不是进来的乙酰基的碳原子被氧化）。对于进入循环的每个乙酰 CoA 来说，3 分子 NAD^+ 被还原为 NADH 需要 3 个电子对，1 分子 FAD 被还原为 $FADH_2$ 需要第 4 个电子对，此外产生了 1 个 GTP（或 ATP）。

NADH 和 $FADH_2$ 携带的电子被汇集到电子传递链，电子传递链以还原 O_2 为 H_2O 而告终。电子传递的能量通过氧化磷酸化被保留在合成的 ATP 中（见节 17-3）。每个 NADH 通过电子传递链大约有 3 个 ATP 从 $ADP + P_i$ 产生，每个 $FADH_2$ 大约产生 2 个 ATP。因此一轮柠檬酸循环最终大约产生 12 个 ATP。

当葡萄糖通过糖酵解转变成 2 分子丙酮酸时，产生 2 分子 ATP，并有 2 分子 NAD^+ 被还原（见节 14-1）。这些 NADH 分子将它们的电子传递给电子传递链，大约产生 6 分子 ATP。当 2 个丙酮酸分子通过丙酮酸脱氢酶复合物转变成 2 个乙酰 CoA 时，产生 2 分子 NADH，最终大约也产生 6 个 ATP。两轮柠檬酸循环（每轮有一个乙酰基加入）产生大约 24 个 ATP。因此，1 分子葡萄糖在有氧条件下能产生大约 38 分子的 ATP，相反在厌氧条件下每分子葡萄糖只能产生 2 分子 ATP。

框 16-3　生物化学相关内容

代谢区室假说

在某些多酶复合物中，如丙酮酸脱氢酶复合物，活性中心之间具有中间物通道的证据，促使一些研究者怀疑，是否在代谢途径中，如柠檬酸循环，酶活性中心之间可能出现更大规模的通道联系。按照代

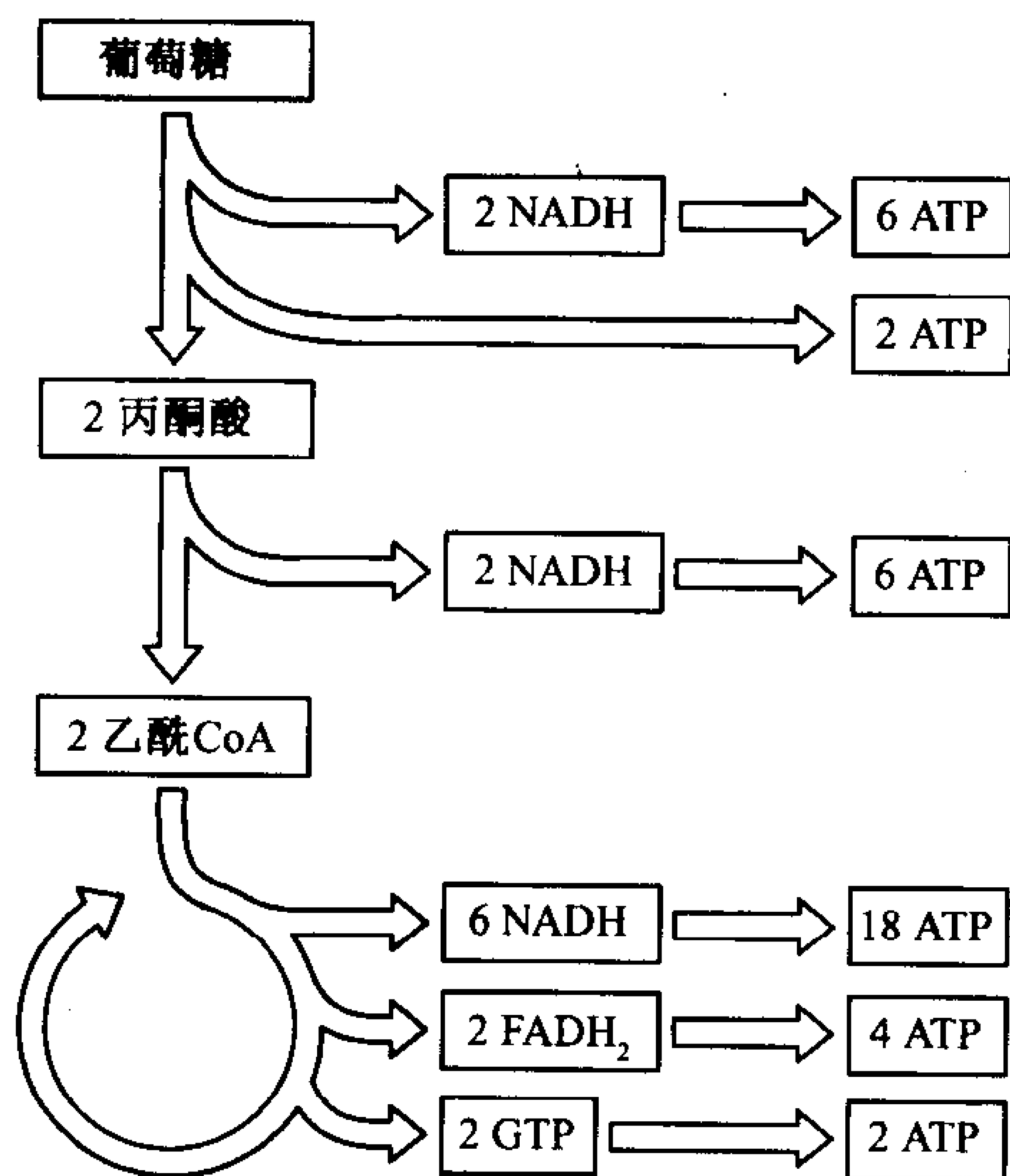
谢区室假说，酶分子非共价性结合在被称为代谢区室的组装体中，代谢区室定位在细胞质或细胞器的某一特殊区域。推测催化顺序反应的酶的邻近效应增加了催化效率，并有助于协同调控代谢途径的全面调节。

支持代谢区室的存在，应该集中在3个标准上：

1）酶必须专一地结合。蛋白质是有点黏性的，因此在代谢区室中，连接酶的弱相互作用必须有别于非专一性的蛋白质-蛋白质相互作用。事实上，一些分离的酶的确彼此结合，但是它并不和无关途径的酶结合。

2）酶的结合在体内必须是可见的。观察被固定的细胞的电子显微镜的发展和观察活细胞的免疫荧光显微镜的发展最终可以提供具体的证据，证明参与同一代谢途径的许多酶并不是无规则地分布在细胞或细胞器中。如参与柠檬酸循环的酶，明显地结合在线粒体内膜的内表面。此外，部分溶解的线粒体酶催化柠檬酸循环反应要比完全溶解的酶快好几倍。

3）代谢区室必须提供对代谢有利的条件，诸如有关快速灵敏的调节或更为有效的催化。不在同一个酶中的活性中心之间的通道效应至今未得到证明。然而对推测性柠檬酸循环代谢区室的两个成员——苹果酸脱氢酶和柠檬酸合酶的计算机模拟提示：当两酶紧密靠近时，电子力能很快地引导草酰乙酸从一个活性中心到另一个活性中心。



484

A. 丙酮酸脱氢酶的调节

鉴于糖的分解代谢通过柠檬酸循环可产生如此大量的ATP，因此来源于糖的乙酰基的进入受到调节也就不足为奇了。丙酮酸脱氢酶复合物催化的丙酮酸的氧化脱羧是不可逆的，因为在哺乳动物中，没有其他途径可从丙酮酸合成乙酰CoA，所以这个反应被精确调控是十分必要的。有两套调控系统被利用：

1）**NADH 和乙酰 CoA 的产物抑制作用。**这些化合物与NAD^+和CoA竞争它们各自酶上的结合位点。NADH和乙酰CoA还驱使可逆的转乙酰基酶(E_2)和二氢硫辛酸脱氢酶(E_3)的反应逆转（图16-5）。因此，高[NADH]/[NAD^+]和[乙酰CoA]/[CoA]比值使E_2维持在乙酰化的状态，而不能从E_1的TPP上接受羟乙基。反过来，将E_1亚基上的TPP固定在羟乙基的状态，降低了丙酮酸脱羧的速率。

2）**E_1 的磷酸化和脱磷酸化共价修饰。**在真核生物中，丙酮酸脱氢酶反应的产物NADH和乙酰CoA，还可以活化与酶复合物结合的丙酮酸脱氢酶激酶。脱氢酶的一个特定的丝氨酸残基被磷酸化，结果使丙酮酸脱氢酶复合物失活（图16-13）。胰岛素是一种发出燃料丰富信号的激素，可通过激活丙酮酸脱氢酶磷酸酶从丙酮酸脱氢酶上移去磷酸基团，从而逆转失活。请回忆一下，胰岛素还可通过激活磷蛋白磷酸酶来活化糖原的合成（见节15-3B）。因此，对血液中葡萄糖浓度升高的应答，胰岛素促进乙酰CoA和糖原的合成。

其他丙酮酸脱氢酶系统的调控因子，包括抑制丙酮酸脱氢酶激酶的丙酮酸和ADP，以及抑

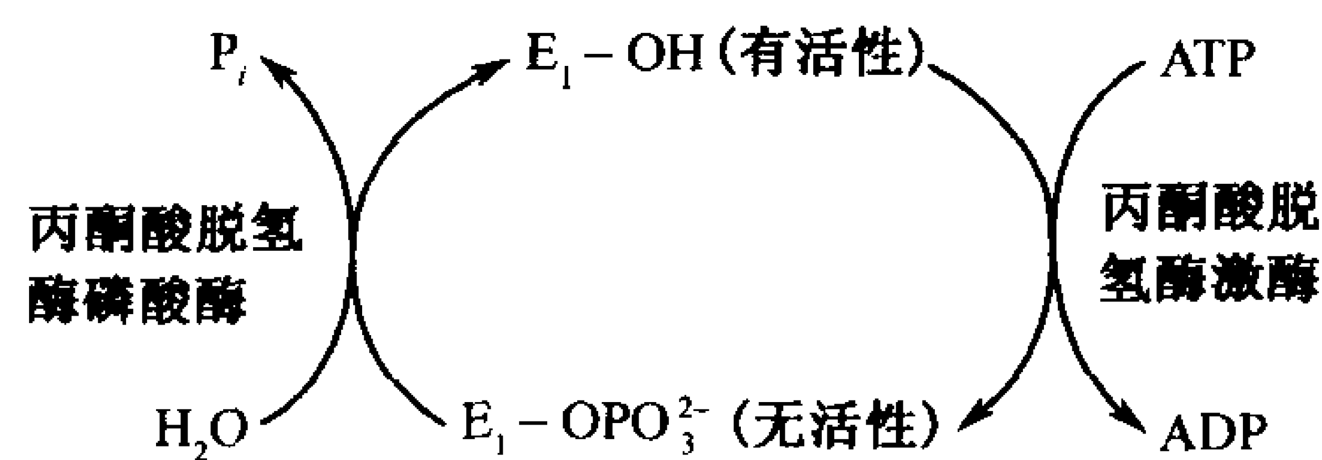


图 16-13　真核生物丙酮酸脱氢酶的共价修饰

E_1 在丙酮酸脱氢酶激酶催化的反应中，通过它的一个丝氨酸残基的特异性磷酸化而失去活性。这个磷酸基通过丙酮酸脱氢酶磷酸酶的作用而被水解，从而再激活 E_1。

制丙酮酸脱氢酶激酶并激活丙酮酸脱氢酶磷酸酶的 Ca^{2+}。与糖原代谢的调控系统相反，丙酮酸脱氢酶的活性不受 cAMP 的影响(见节 15-3B)。　485

B. 柠檬酸循环的限速酶

为了了解代谢途径是如何被调控的，我们必须知道催化它的限速步骤的酶、酶的体外效应物以及这些底物的体内浓度。假设的流量调控机制必须可在效应物的生理浓度范围内进行。

确定三羧酸循环的限速步骤比确定糖酵解的限速步骤困难，因为循环的大多数代谢物同时存在于线粒体和细胞质中，而我们不知道它们在这两个区域之间的分布情况(回忆一下，确定一个途径的限速步骤，需要根据各个反应的底物和产物浓度测定反应的 ΔG)。然而，我们可假定各细胞区域是平衡的，并用细胞中这些物质的总浓度来估计它们在线粒体中的浓度。表 16-2 给出了 8 种柠檬酸循环酶的标准自由能变化，并估算在心肌和肝组织中，这些反应的自由能的变化。我们可以看到其中有 3 种酶可能在生理条件下催化其反应进行到远远偏离平衡的水平(ΔG 为负值)，这 3 种酶是柠檬酸合酶、依赖于 NAD^+ 的异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶。因此它们是循环中的限速酶。　486

表 16-2　柠檬酸循环反应的标准自由能变化($\Delta G^{\circ\prime}$)和生理自由能变化(ΔG)

反应	酶	$\Delta G^{\circ\prime}$ /(kJ·mol⁻¹)	ΔG /(kJ·mol⁻¹)
1	柠檬酸合酶	−31.5	负值
2	顺乌头酸酶	~5	~0
3	异柠檬酸脱氢酶	−21	负值
4	α-酮戊二酸脱氢酶多酶复合物	−33	负值
5	琥珀酰 CoA 合成酶	−2.1	~0
6	琥珀酸脱氢酶	+6	~0
7	延胡索酸酶	−3.4	~0
8	苹果酸脱氢酶	+29.7	~0

在柠檬酸循环很活跃的心肌中，通过柠檬酸循环的代谢物的流量，与细胞的耗氧量是成比例的。因为氧的消耗、NADH 的重新氧化和 ATP 的产生是紧密偶联的(见节 17-3)，柠檬酸循环必须通过协调 NADH 产生与能量消耗的反馈机制来调节。不像糖酵解和糖原代谢中的限速酶是

通过精细的别构调控系统、底物循环和共价修饰来调节流量，柠檬酸循环的调节酶似乎是通过三种简单的机制来调控流量：①底物的存在；②产物的抑制作用；③循环中间物进一步进入循环的竞争性反馈抑制。一些主要的调控机制列在图 16-14 中。柠檬酸循环中没有单一的流量调控点，而是好几种酶参与流量的调控。

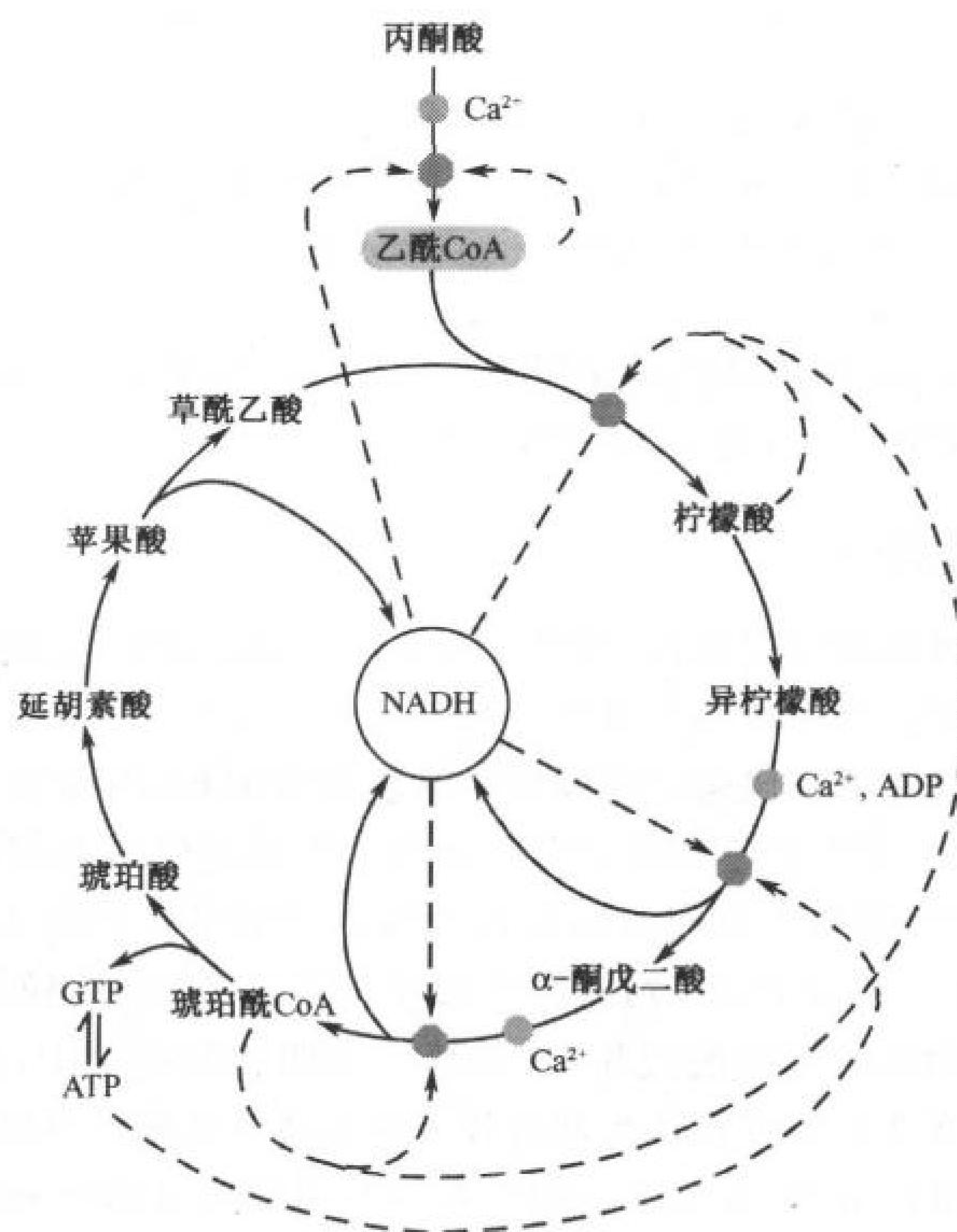


图 16-14　柠檬酸循环的调控

包括丙酮酸脱氢酶反应的柠檬酸循环，本图指出了抑制位点（红色的八边形）和作为抑制剂的途径的中间物（红色虚线箭头）。ADP 和 Ca^{2+}（绿色圆点）是激活剂。

柠檬酸循环中最主要的调控物质可能是它的底物乙酰 CoA 和草酰乙酸，以及它的产物 NADH。乙酰 CoA 和草酰乙酸在线粒体中的浓度都未达到使柠檬酸合酶饱和的水平。因此，通过酶的代谢流量随底物浓度而变化，并被底物的存在调控。我们已经看到，从丙酮酸生成乙酰 CoA是被丙酮酸脱氢酶的活性调控。与苹果酸平衡的草酰乙酸的浓度，根据以下平衡表达式随[NADH]/[NAD^+]之比而变化。

$$K=\frac{[\text{草酰乙酸}][\text{NADH}]}{[\text{苹果酸}][\text{NAD}^+]}$$

举个例子，如果肌肉的工作负荷和呼吸速率增加，线粒体的 NADH 的浓度下降，随之引起草酰乙酸浓度的增加，刺激柠檬酸合酶反应，而这个反应控制了柠檬酸生成的速率。

顺乌头酸酶的功能是促使反应达到平衡，所以柠檬酸消耗的速率取决于依赖 NAD^+ 的异柠檬酸脱氢酶的活性。依赖 NAD^+ 的异柠檬酸脱氢酶在体外被它的产物 NADH 强烈抑制。柠檬酸合酶也被 NADH 抑制，但是其敏感性要比异柠檬酸脱氢酶对 NADH 浓度的变化的敏感性低

一些。

柠檬酸循环中产物抑制的其他例子，是柠檬酸合酶被柠檬酸（柠檬酸与草酰乙酸的竞争）抑制，α-酮戊二酸脱氢酶被琥珀酰 CoA 抑制。琥珀酰 CoA 还在柠檬酸合酶反应（竞争性反馈抑制）中与乙酰 CoA 竞争，这个相互牵制的系统使柠檬酸循环协调调节。

其他调节机制

对参与柠檬酸循环酶的体外研究，鉴定了一些别构激活剂和别构抑制剂。ADP 是异柠檬酸脱氢酶的别构激活剂，而 ATP 抑制这个酶。Ca^{2+} 除了它的许多其他细胞功能外，还在几个位点上调节柠檬酸循环。它激活丙酮酸脱氢酶磷酸酶（图 16-13），该酶回过来再激活丙酮酸脱氢酶复合物，从而产生乙酰 CoA。Ca^{2+} 也激活异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶（图 16-14）。因此，Ca^{2+} 不仅是刺激肌肉收缩的信号，而且也促进 ATP 的生成，以提供能量。　487

在大肠杆菌中，异柠檬酸脱氢酶通过丝氨酸残基的磷酸化失去活性。然而与大多数其他的由磷酸化和去磷酸化调节的酶不同，大肠杆菌异柠檬酸脱氢酶并不是在别构部位，而是在活性中心被磷酸化。被磷酸化的酶的结构类似于未修饰酶的结构，可能是静电斥力阻止了磷酸化的酶与它的阴离子底物异柠檬酸的结合。

5. 与柠檬酸循环有关的反应

初看上去，一个代谢途径或表现为释放和保存自由能的分解代谢，或表现为需要自由能的合成代谢。当然，柠檬酸循环是分解代谢，因为它涉及降解，并且在大多数生物中，它是一个主要的保存自由能的系统。循环的中间物，仅需催化量，就可维持该循环的降解功能。然而，好几种生物合成途径利用柠檬酸循环的中间物作为合成反应的起始物。因此柠檬酸循环是**两用代谢途径**（amphibolic，既是合成代谢又是分解代谢）。在这节中我们要讨论使中间物进入柠檬酸循环或移去中间物的一些反应；我们还要讨论**乙醛酸途径**（glyoxylate pathway），一个仅存在于植物中的柠檬酸循环的变体形式，它将乙酰 CoA 转变成草酰乙酸。一些利用和添补柠檬酸循环中间物的反应总结在图 16-15 中。

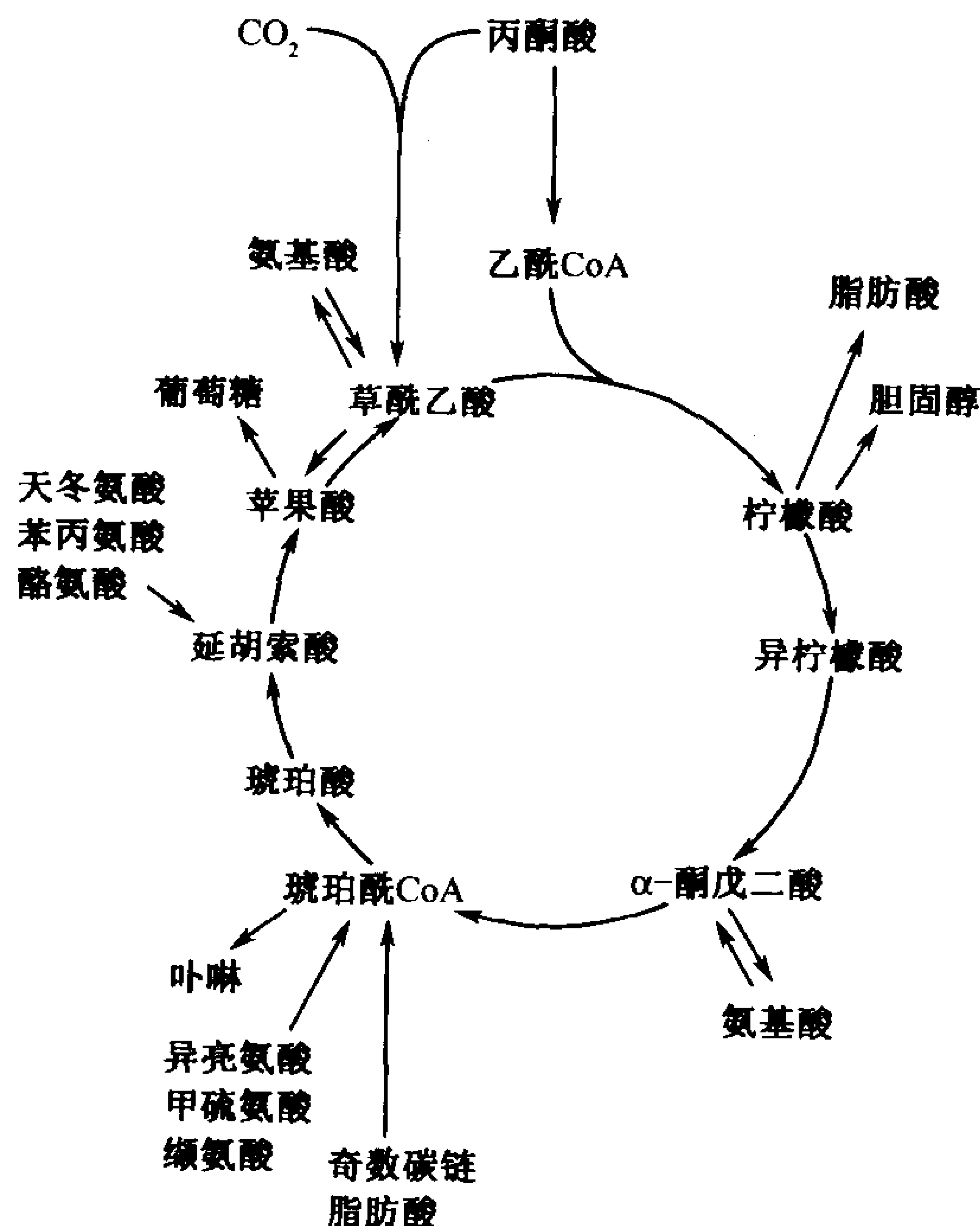


图 16-15　柠檬酸循环的两用代谢功能
该图指出被移去用于合成代谢的中间物的位置（红色箭头）和添补反应补充循环中间物的位置（绿色箭头）。反应所涉及的氨基酸的转氨和脱氨是可逆的，因此它们的反应方向随代谢需要而变化。

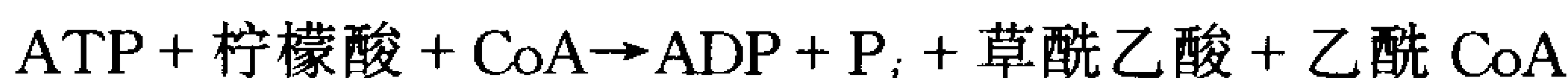
A. 利用柠檬酸循环中间物的途径

柠檬酸循环的中间物是糖、脂肪酸和氨基酸生物合成的前体：

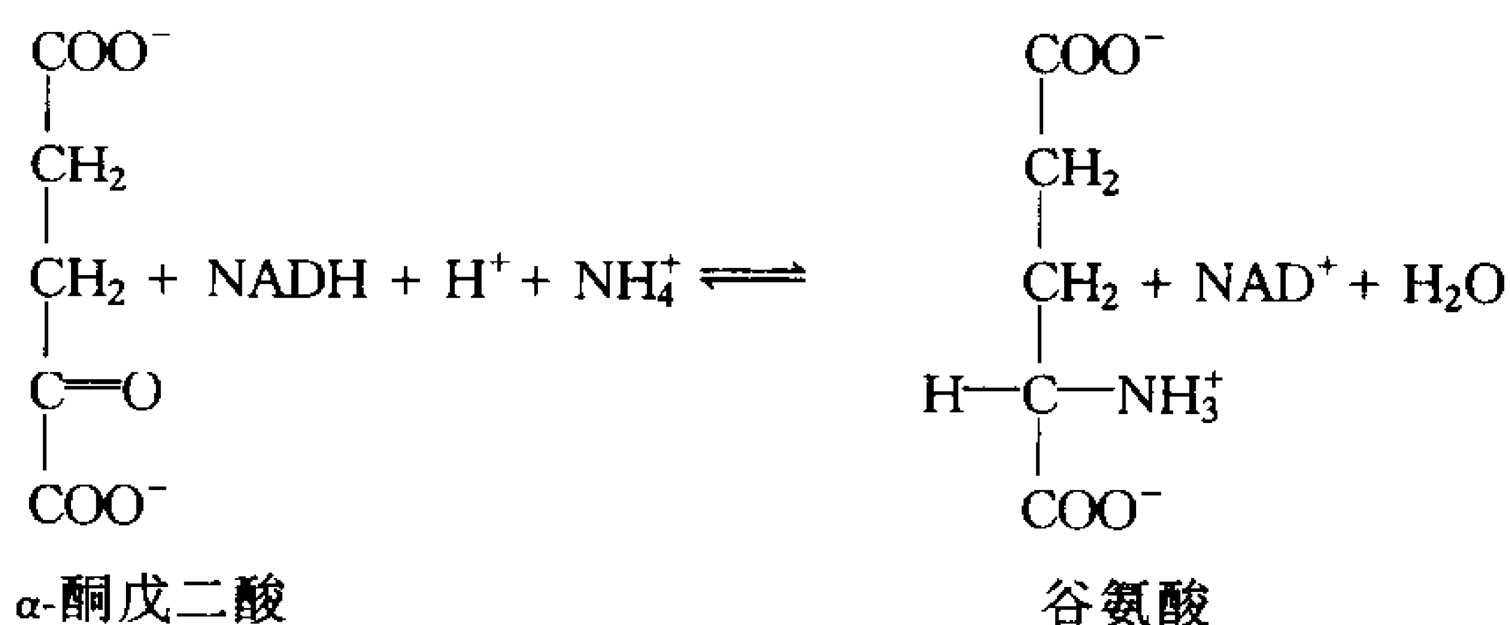
1）我们已经知道可以从草酰乙酸合成

葡萄糖(见节 15-4)。因为糖异生作用发生在细胞质中,因此草酰乙酸必须转变成苹果酸或天冬氨酸以转运出线粒体(图 15-27)。

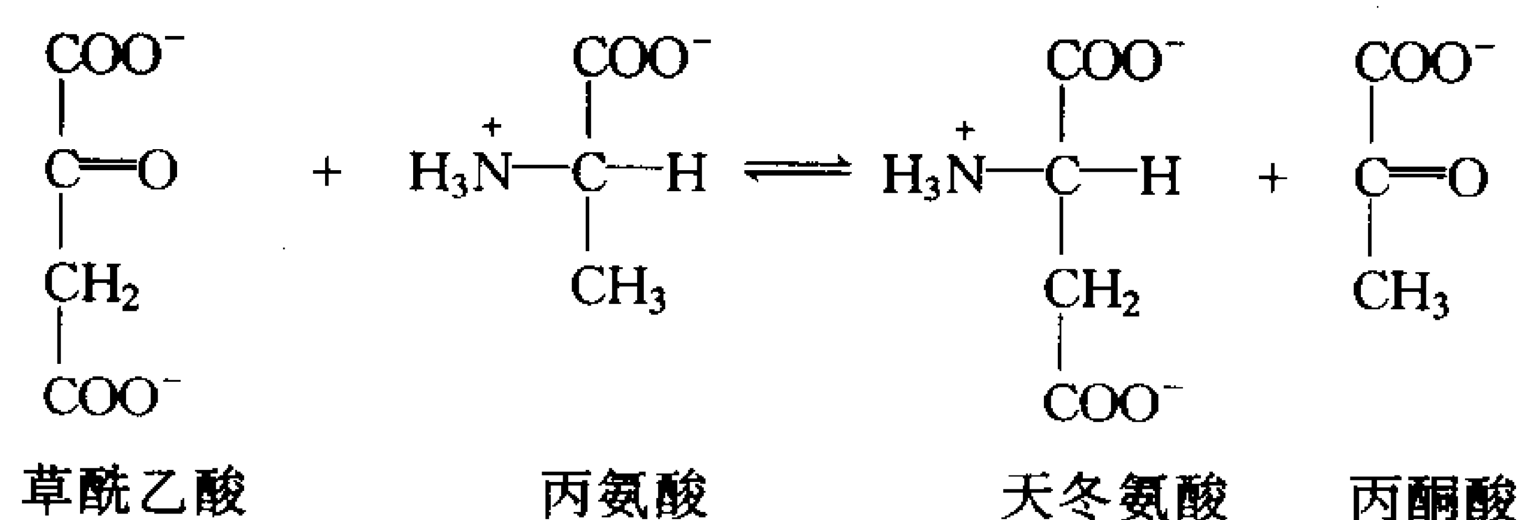
2) 脂肪酸的合成是在细胞质中进行的过程,需要乙酰 CoA 。乙酰 CoA 在线粒体中产生,但并不能穿过线粒体膜。因此细胞质中的乙酰 CoA 是通过 **ATP-柠檬酸裂解酶**(ATP-citrate lyase)的催化,将能通过线粒体膜的柠檬酸裂解而生成(见节 19-4A)。该反应利用 ATP 的自由能来"解开"柠檬酸合酶的反应。



3) 氨基酸生物合成利用 α-酮戊二酸和草酰乙酸作为起始物质。如 α-酮戊二酸通过**谷氨酸脱氢酶**催化的还原氨化反应而转变成谷氨酸。该反应需要 NADH 或 NADPH。



草酰乙酸与丙氨酸发生转氨反应,产生天冬氨酸和丙酮酸(见节 20-2A)。



B. 柠檬酸循环中间物的添补反应

在需氧生物中,柠檬酸循环是自由能的主要来源,因此柠檬酸循环的分解代谢功能是不能被干扰的。消耗掉的循环中间物必须添补。添补反应被称为**回补反应**(anaplerotic reaction)(来源于希腊字,意即"填充")。最重要的回补反应是由丙酮酸羧化酶催化的,从丙酮酸产生草酰乙酸。



(这也是糖异生作用的第一步;见节 15-4A)。丙酮酸羧化酶通过它的激活剂乙酰 CoA 来"感觉"对柠檬酸循环中间物更多的需要。任何因草酰乙酸或其他中间物不足造成的循环速率的降低,都会使乙酰 CoA 的浓度升高,这激活了添补草酰乙酸的丙酮酸羧化酶。柠檬酸循环中的这些反应将草酰乙酸转变为柠檬酸、α-酮戊二酸、琥珀酰 CoA 等,直到所有的中间物都回复到一个适当的水平。

其他进入柠檬酸循环的代谢物有琥珀酰 CoA、奇数碳链脂肪酸的降解产物(见节 19-2E)和一些氨基酸(见节 20-4),以及如前面指出的,通过某些氨基酸的可逆转氨作用而生成的 α-酮戊二酸和草酰乙酸。

C. 乙醛酸途径

植物,而不是动物,具有可使乙酰 CoA 净转变为草酰乙酸的酶,草酰乙酸能为糖异生作用所利用,这些酶组成了乙醛酸途径(图 16-16)。乙醛酸循环发生在两个细胞区室中:线粒体和**乙醛**

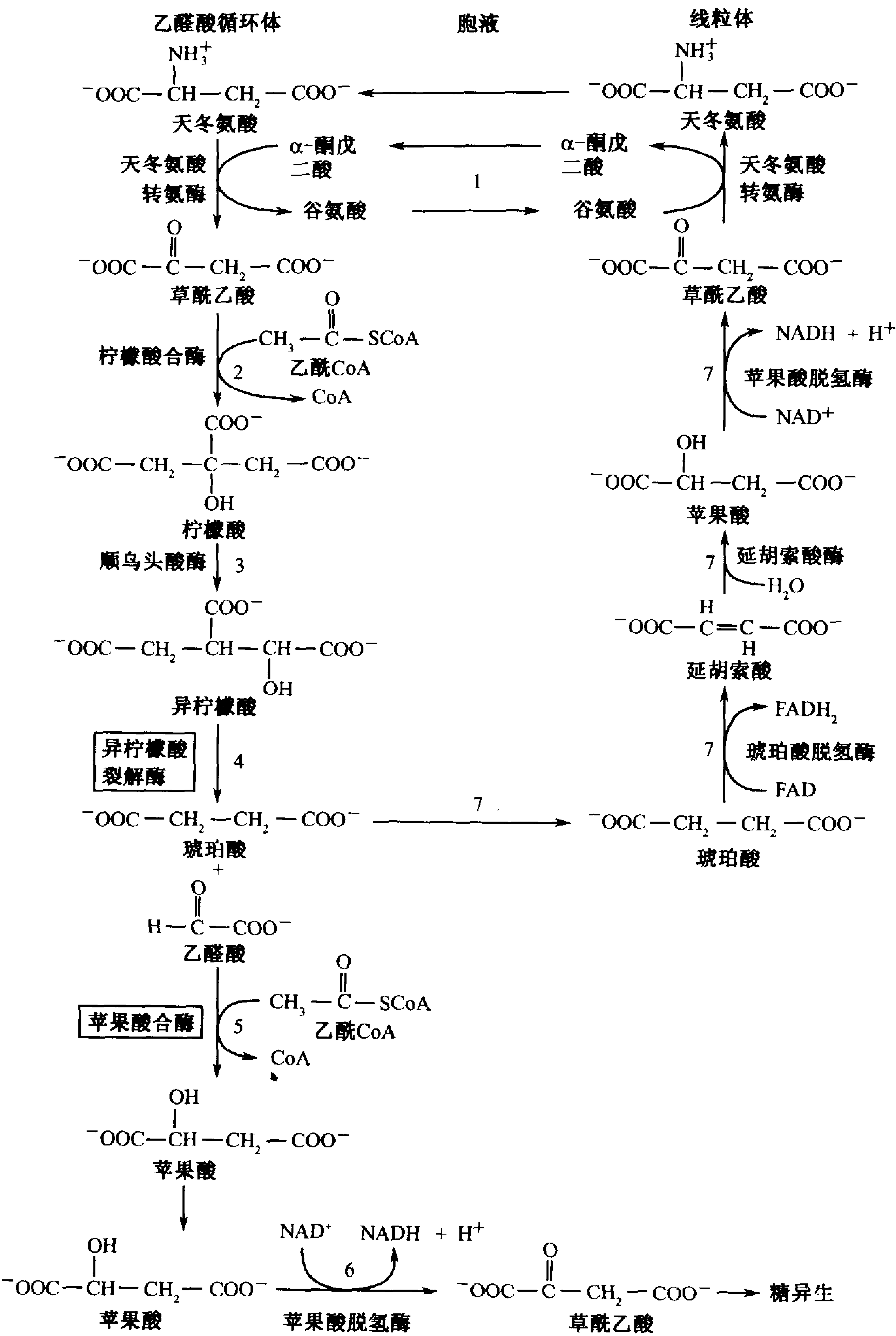


图 16-16　代谢的秘诀:乙醛酸途径

存在于线粒体和乙醛酸循环体中的酶都是需要的。植物乙醛酸循环体特有的异柠檬酸裂解酶和苹果酸合酶，用方框框出。这途径使 2 个乙酰 CoA 净转变为 1 个草酰乙酸。(1)线粒体草酰乙酸转变为天冬氨酸，转运到乙醛酸循环体，并重新转变为草酰乙酸。(2)草酰乙酸和乙酰 CoA 缩合生成柠檬酸。(3)顺乌头酸酶催化柠檬酸转变为异柠檬酸。(4)异柠檬酸裂解酶催化异柠檬酸裂解为琥珀酸和乙醛酸。(5)苹果酸合酶催化乙醛酸与乙酰 CoA 缩合，生成苹果酸。(6)苹果酸转运到胞质后，被氧化成草酰乙酸，草酰乙酸能为糖异生所利用。(7)琥珀酸被转运到线粒体，在那里它经过柠檬酸循环，重新转变为草酰乙酸。

酸循环体(glyoxysome)。乙醛酸循环体是一种膜结合的植物细胞器,它是特殊的过氧化物酶体。乙醛酸途径中的大多数酶,与柠檬酸循环中的酶相同。

490

1) 线粒体中的草酰乙酸转变成天冬氨酸,并被转运到乙醛酸循环体中,在那里它重新转变为草酰乙酸。
2) 草酰乙酸与乙酰 CoA 缩合形成柠檬酸。
3) 就像在柠檬酸循环中一样,柠檬酸转变成异柠檬酸。
4) 乙醛酸循环体中的**异柠檬酸裂解酶**(isocitrate lyase)催化异柠檬酸裂解为琥珀酸和**乙醛酸**(glyoxylate)。琥珀酸被转运到线粒体,在那里它进入柠檬酸循环,转变回草酰乙酸,完成循环。因此乙醛酸途径的结果是使乙酰 CoA 净转变为乙醛酸,以此代替柠檬酸循环,使之转变为 2 分子 CO_2。
5) **苹果酸合酶**(malate synthase)是乙醛酸循环体中的酶,它使乙醛酸与第二分子的乙酰 CoA 缩合生成苹果酸。
6) 苹果酸离开乙醛酸循环体,细胞质中的苹果酸脱氢酶通过 NAD^+ 催化苹果酸氧化成草酰乙酸。

因此乙醛酸循环的总反应是从 2 分子乙酰 CoA 生成 1 分子草酰乙酸:



$$2\text{ 乙酰 CoA} + 2NAD^+ + FAD + 3H_2O \longrightarrow \text{草酰乙酸} + 2CoA + 2NADH + FADH_2 + 4H^+$$

异柠檬酸裂解酶和苹果酸合酶仅存在于植物中。这些酶使发芽的种子将它们贮存的三酰甘油转变为乙酰 CoA,再转变为葡萄糖。缺乏乙醛酸途径的生物,不能从乙酰 CoA 进行葡萄糖的净合成。

小　结

1. 柠檬酸循环的 8 种酶,在多步催化循环中,将 1 个乙酰基氧化成 2 分子 CO_2,同时生成 3 个 NADH、1 个 FDH_2 和 1 个 GTP。当还原辅酶最终还原 O_2 时,释放的自由能用于生成 ATP。
2. 乙酰基以乙酰 CoA 的形式进入柠檬酸循环。包含 3 种酶和 5 种辅酶的丙酮酸脱氢酶多酶复合物,使糖酵解产物丙酮酸转变为乙酰 CoA。E_2 的硫辛酰赖氨酰臂就像一条系绳一样,在多酶复合物中各种酶的反应基团之间摆动。
3. 柠檬酸合酶在一高度放能的反应中,催化乙酰 CoA 和草酰乙酸的缩合。
4. 顺乌头酸酶催化柠檬酸到异柠檬酸的异构化作用,异柠檬酸脱氢酶催化异柠檬酸氧化脱羧为 α-酮戊二酸,并产生柠檬酸循环的第一个 CO_2 和 NADH。
5. α-酮戊二酸脱氢酶催化 α-酮戊二酸的氧化脱羧,生成琥珀酰 CoA 和柠檬酸循环的第二个 CO_2 和 NADH。
6. 琥珀酰 CoA 合成酶,通过磷酰蛋白质中间物,将琥珀酰 CoA 的裂解与 GTP(在一些生物中是 ATP)的合成相偶联。
7. 柠檬酸循环余下的 3 步反应由琥珀酰脱氢酶、延胡索酸酶和苹果酸脱氢酶催化,重新生成草酰乙酸以继续柠檬酸循环。
8. 乙酰 CoA 进入柠檬酸循环是在丙酮酸脱氢酶这一步,通过产物抑制(NADH 和乙酰 COA)和共价修饰来调节。
9. 柠檬酸循环本身是在柠檬酸合酶、依赖于 NAD^+ 的异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶催化的这些步骤被调节,主要通过底物的存在、产物抑制和反馈抑制来完成调节。

10. 一些柠檬酸循环的中间物是糖异生、脂肪酸合成和氨基酸合成的底物。回补反应如丙酮酸羧化酶反应，添补了柠檬酸循环的中间物。

11. 仅在植物中存在的乙醛酸途径，需要乙醛酸循环体中的酶，异柠檬酸裂解酶和苹果酸合酶。这个柠檬酸循环的变体可以从乙酰 CoA 净合成葡萄糖。

参考文献

Barry, J.M., Enzymes and symmetrical molecules, *Trends Biochem. Sci.* **22**, 228–230 (1997).

Bolduc, J.M., Dyer, D.H., Scott, W.G., Singer, P., Sweet, R.M., Koshland, D.E., Jr., and Stoddard, B.L., Mutagenesis and Laue structures of enzyme intermediates: isocitrate dehydrogenase, *Science* **268**, 1312–1318 (1995).

Mattevi, A., de Kok, A., and Perham, R.N., The pyruvate dehydrogenase multienzyme complex, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 877–887 (1992).

Remington, J.S., Mechanisms of citrate synthase and related enzymes (triose phosphate isomerase and mandelate racemase), *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2**, 730–735 (1992).

Srere, P.A., Wanderings (wonderings) in metabolism, *Biol. Chem. Hoppe Seyler* **374**, 833–842 (1993). [A brief review of the metabolon hypothesis and some supporting evidence.]

关键词

多酶复合物　multienzyme complex

催化循环　catalytic cyde

回补反应　anaplerotic reaction

乙醛酸途径　glyoxylate pathway

硫辛酰赖氨酰臂　lipoyllysyl arm

两用代谢途径　amphibolic pathway

学习思考题

1. 描述丙酮酸脱氢酶多酶复合物的 5 个反应。
2. 画出柠檬酸循环 8 个中间物的结构，并命名催化它们相互转变的酶。
3. 写出丙酮酸、乙酰 CoA 和葡萄糖氧化为 CO_2 的净反应式。
4. 柠檬酸循环的哪几步调节该循环的流量？
5. 描述 Ca^{2+}、乙酰 CoA 和 NADH 在调节丙酮酸脱氢酶和柠檬酸循环中的作用。
6. 解释催化循环如何为其他代谢途径提供前体而不会耗尽它自己的中间物。
7. 描述乙醛酸途径的反应。

练　习　题

1. (a) 解释为什么专性厌氧菌含有一些柠檬酸循环的酶。

   (b) 为什么这些生物没有一个完整的柠檬酸循环。

2. 地球上最初的生物可能是化能自养生物，在这种生物中，柠檬酸循环以逆转的方式将大气中的 CO_2“固定”到有机化合物中。试以琥珀酸 + $2CO_2$→柠檬酸总反应开始，完成催化循环。

3. 一轮柠檬酸循环产生的 CO_2，并非来自参加该循环的乙酰碳。

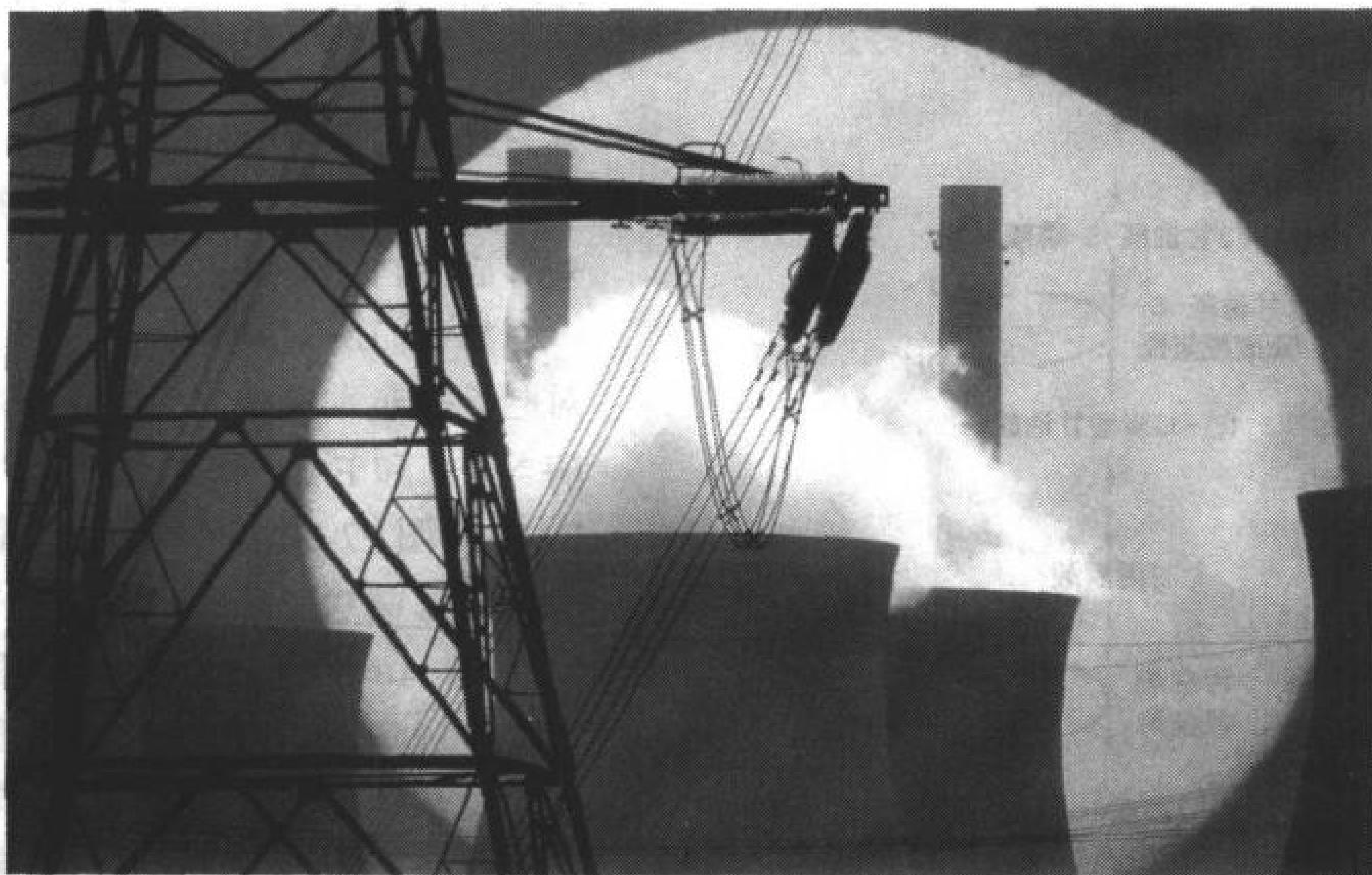
   (a)如果用 ^{14}C 标记乙酰 CoA 的羰基碳，在 $^{14}CO_2$ 被释放前，需要多少轮循环？

   (b)如果乙酰 CoA 被标记在它的甲基上，需要多少轮循环？

4. 支链 α-酮酸脱氢酶复合物参与氨基酸的分解代谢，它包含了与丙酮酸脱氢酶复合物和 α-酮戊二酸脱氢酶复合物相同的三种酶。当缬氨酸象谷氨酸⟹α-酮戊二酸反应一样脱氨（见节 16-5A），然后通过支链 α-酮酸脱氢酶作用时，写出反应产物。
5. 参考表 13-3，解释在琥珀酸脱氢酶反应中为什么用 FAD 而不用 NAD^+？
6. 在琥珀酸脱氢酶反应中，丙二酸是琥珀酸的竞争性抑制剂。解释为什么增加草酰乙酸的浓度可以克服丙二酸的抑制作用。
7. 回补反应允许柠檬酸循环补充用于生物合成途径的中间物，同时维持循环中间物在一个合适的水平。写出从丙酮酸净合成柠檬酸的反应式。
8. 根据以下信息，计算 25℃、pH7.0 时异柠檬酸脱氢酶反应的生理 ΔG：$[NAD^+]/[NADH] = 8$，[α-酮戊二酸] = $0.1mmol \cdot L^{-1}$，[异柠檬酸] = $0.02mmol \cdot L^{-1}$。假定 CO_2 为标准状态（$\Delta G^{\circ\prime}$ 见表 16-2）。这个反应是代谢调控的可能位点吗？
9. 用同位素示踪物研究代谢时，来自不对称分子的标记原子，在通过一个想象的对称的中间物后并不总是均匀地"混杂"，这个观察违背代谢区室假说吗？试解释。
10. 虽然动物并不能从乙酰 CoA 合成葡萄糖，如果用 ^{14}C 标记的乙酸盐喂大鼠，一些标记会出现在从它的肌肉提取的糖原中，试解释。

（南京大学　陈钧辉　译）

第 17 章　电子传递和氧化磷酸化



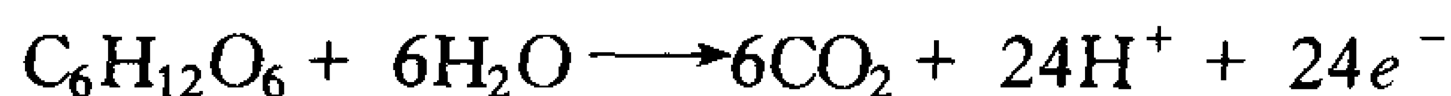
线粒体氧化代谢燃料以产生细胞可以利用的能量，这种方式类似于发电厂用燃料生产工业和家庭所需的电能。细胞内的机构是如何做到这一点的？它又是如何调节能量输出以满足细胞所需的？(引自 David Jeffrey / The Image Bank)

耗氧型生物体在氧化代谢燃料的过程中消耗氧并产生二氧化碳。例如，葡萄糖($C_6H_{12}O_6$)被分子氧完全氧化



$$C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 6H_2O$$

可以分成两个由代谢机构完成的半反应。第一步，葡萄糖的碳原子被氧化：



$$C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \longrightarrow 6CO_2 + 24H^+ + 24e^-$$

第二步,分子氧被还原:



$$6O_2 + 24H^+ + 24e^- \longrightarrow 12H_2O$$

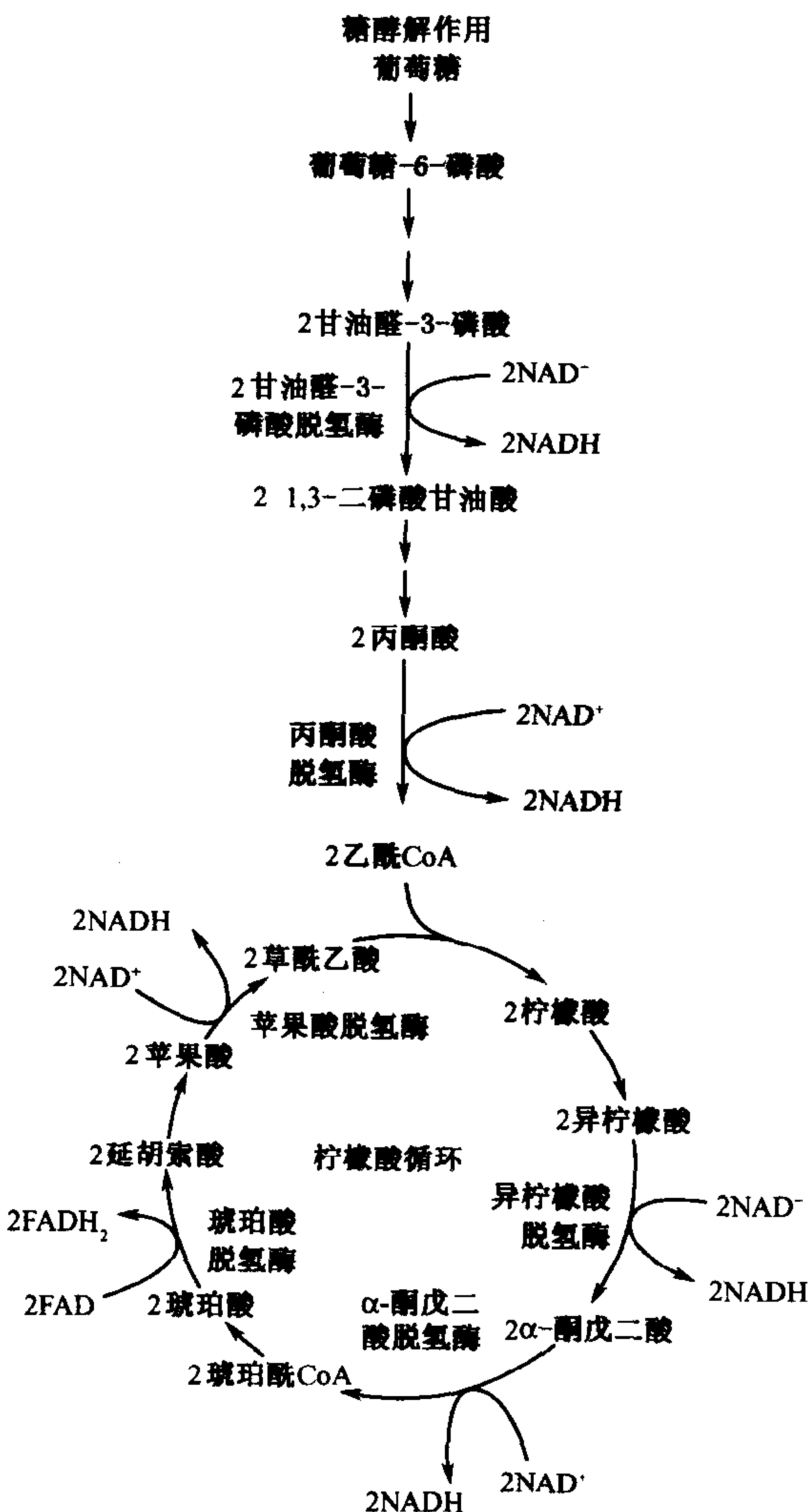


图 17-1　糖酵解和柠檬酸循环中形成 NADH 和 $FADH_2$ 的电子传递部位

我们已经知道第一个半反应是由糖酵解和柠檬酸循环(另一类主要的代谢燃料——脂肪的降解也需要柠檬酸循环)的酶促反应完成的。这一章我们将描述电子从还原型的燃料传递到分子氧的途径。我们还将考查燃料氧化产生的能量如何被储存和用来合成 ATP。

如我们所知,葡萄糖氧化时释放的 12 对电子并非直接传递给 O_2,而是传递给辅酶 NAD^+ 和 FAD,形成 10 个 NADH 和 2 个 $FADH_2$(图 17-1)。这些反应由糖酵解的酶甘油醛-3-磷酸脱氢酶(节 14-2F)、丙酮酸脱氢酶(节 16-2B)和柠檬酸循环酶系中的异柠檬酸脱氢酶、α-酮戊二酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶催化(节 16-3)。随后电子被传递进入**线粒体的电子传递链**(mitochondrial electron-transport chain),这是一个由若干连续的电子传递体组成的系统。在电子传递过程中发生以下事件:

1) 通过将电子传递给其他物质,NADH 和 $FADH_2$ 又重新被氧化为 NAD^+ 和 FAD,以便能够参与其他底物的氧化反应。

2) 在将 O_2 还原为 H_2O 以前,被传递的电子至少要参与 10 个**氧化还原中心**(redox center,进行氧化还原反应的基团)的连续氧化还原反应,这些氧化还原中心分布在 4 个酶复合体中。

3) 在电子传递过程中,质子从线粒体中排出,形成跨线粒体膜的质子浓度梯度。该电化学梯度中储存的自由能驱动 ADP 和 P_i 通过**氧化磷酸化**(oxidative phosphorylation)合成 ATP。

1. 线粒体

线粒体(希腊语:mitos,细线 + chondros,微粒)是真核细胞氧化代谢的部位。线粒体含有丙

酮酸脱氢酶、柠檬酸循环的酶系、催化脂肪酸氧化(节 19-20)的酶和参与电子传递和氧化磷酸化的酶以及氧化还原蛋白。因此我们有理由将线粒体称为细胞的发电厂。

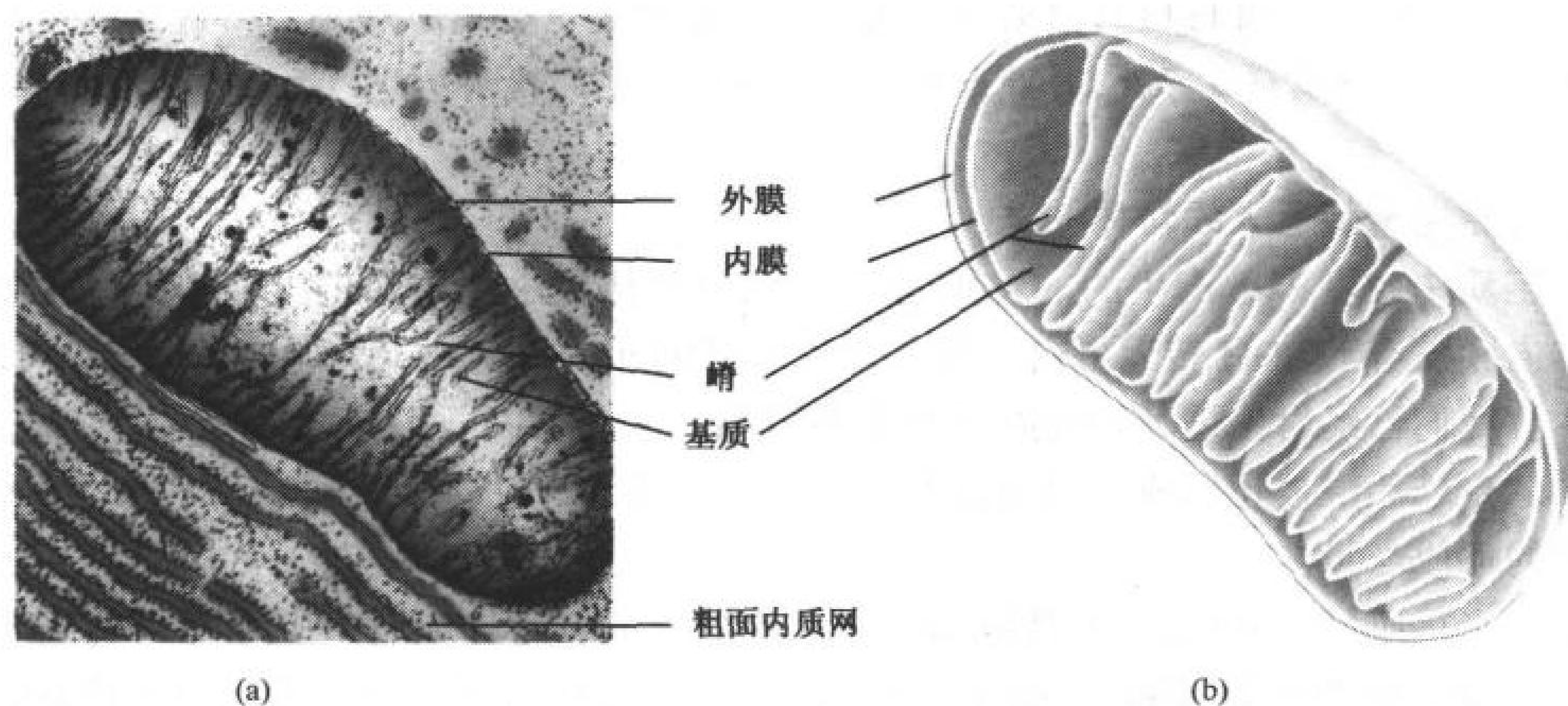


图 17-2　线粒体

(a)动物线粒体的电镜图。(引自 K. R. Porter/Photo Researchers, Inc.)(b)线粒体的横切面图。

A. 线粒体的结构

494

线粒体的大小、形状因来源和代谢状态不同而有差异，但通常呈大小约为 0.5μm×1.0μm 的椭球体，这与细菌的大小差不多。一个真核细胞大约含有 2000 个线粒体，约占细胞总体积的 1/5。线粒体被一层光滑的外膜包围，内部有一层广泛向内褶叠的内膜，称为**嵴**(cristae，拉丁语：crests)(图 17-2)。嵴的数目反映细胞呼吸作用的强弱。参与电子传递和氧化磷酸化作用的蛋白嵌合于线粒体内膜上，因此呼吸速率因膜表面积不同而异。

内膜将线粒体划分为两部分，**膜间隙**(intermembrane space)和内部的**基质**(matrix)。基质是凝胶样溶液，含有许多高浓度的可溶性氧化代谢酶及其底物、核苷酸协同因子和无机离子。基质还含有线粒体的遗传构件——DNA、RNA 和核糖体，它们产生部分(而不是全部)线粒体蛋白。

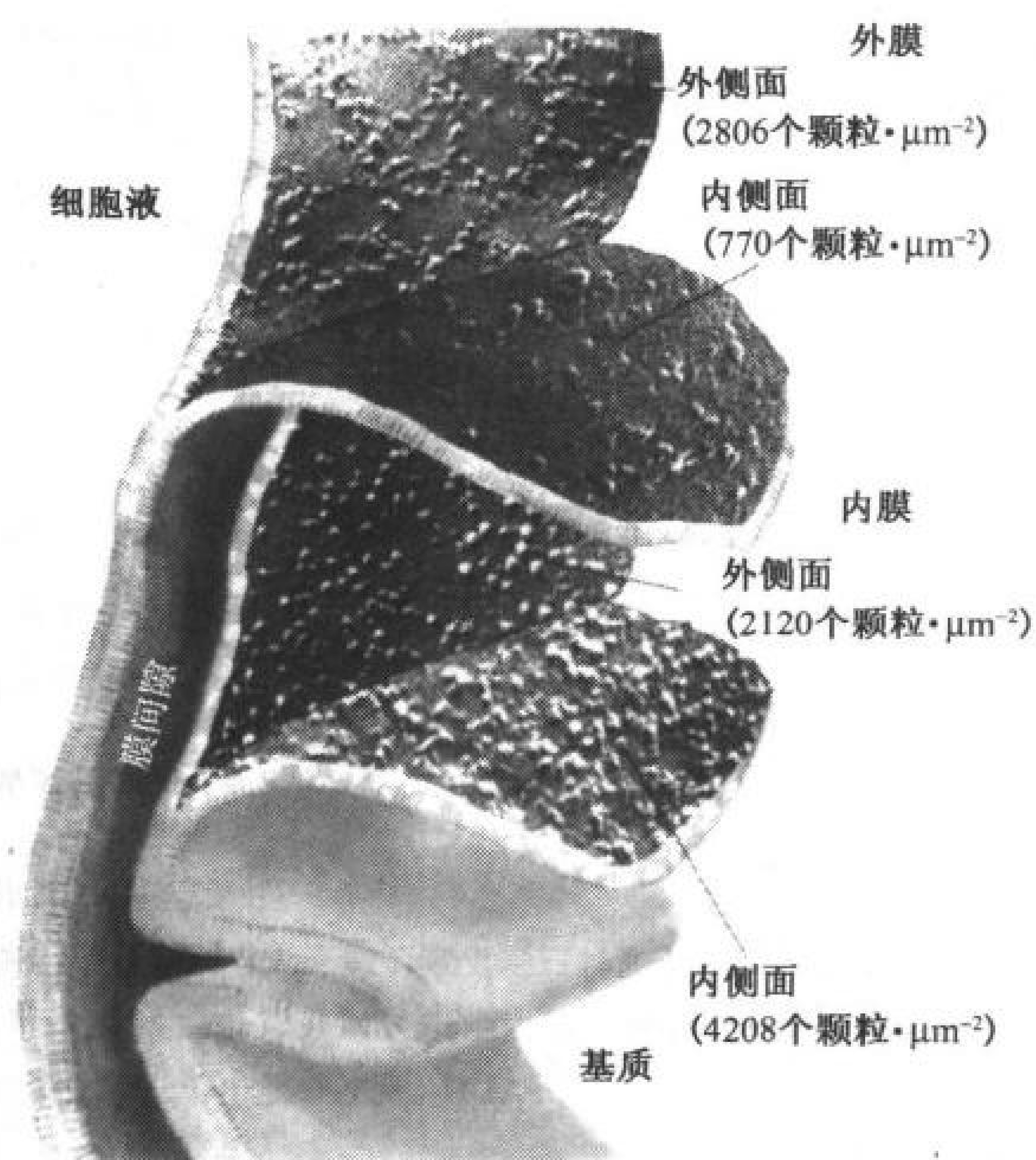


图 17-3　线粒体内膜和外膜的冰冻撕裂和冰冻蚀刻电镜图

内膜含有的包埋粒子的密度大约是外膜的 2 倍。(引自 L. Packer, University of California at Berkeley)

B. 线粒体的转运系统

就像细菌的外膜一样，线粒体的外膜含有孔蛋白，这种蛋白允许相对分子质量为 10kDa 以下的分子自由扩散(节 10-4B)。因此膜间隙的代谢物浓度和离子浓度与细胞

质的相同。内膜约含 75%(以质量计)的蛋白质,远远高于外膜的蛋白质含量(图 17-3)。除了呼吸链蛋白,内膜还含有为数众多的调控某些代谢物如 ATP、ADP、丙酮酸,Ca^{2+} 和磷酸盐输运的转运蛋白,它们只允许 O_2、CO_2 和 H_2O 自由通透。线粒体内膜对大多数离子和代谢物的可调控的非通透性使跨膜离子浓度梯度得以产生,并导致细胞质与线粒体之间代谢功能的区域化。

细胞质的还原当量转运入线粒体

在细胞质中经糖酵解产生的 NADH 必须进入线粒体的电子传递链以便进行有氧氧化。然而线粒体内膜没有 NADH 转运蛋白。来自胞质 NADH 的电子只能通过一种精妙的穿梭系统进入线粒体。我们已经讨论过“**苹果酸-天冬氨酸穿梭**”(malate-aspartate shuttle)(图 15-27),该过程中胞质的草酰乙酸被还原成苹果酸进入线粒体。当苹果酸在基质中重新氧化时,就释放出源于细胞质的还原当量。

在昆虫飞行肌(已知的最大的持续输出能量的组织——其动力:重量比值几乎与一台小型汽车引擎相同)的“**磷酸甘油穿梭**”(glycerophosphate shuttle)中(图 17-4),**甘油 3-磷酸脱氢酶**(3-phosphoglycerol dehydrogenase)催化二羟丙酮磷酸将细胞质的 NADH 氧化为 NAD^+,后者重新进入糖酵解。反应生成的**甘油 3-磷酸**(3-phosphoglycerol)进入线粒体,将电子传递给**黄素蛋白脱氢酶**(flavoprotein dehydrogenase)而形成 $FADH_2$。该酶位于线粒体内膜的外表面,直接为电子传递链提供电子。

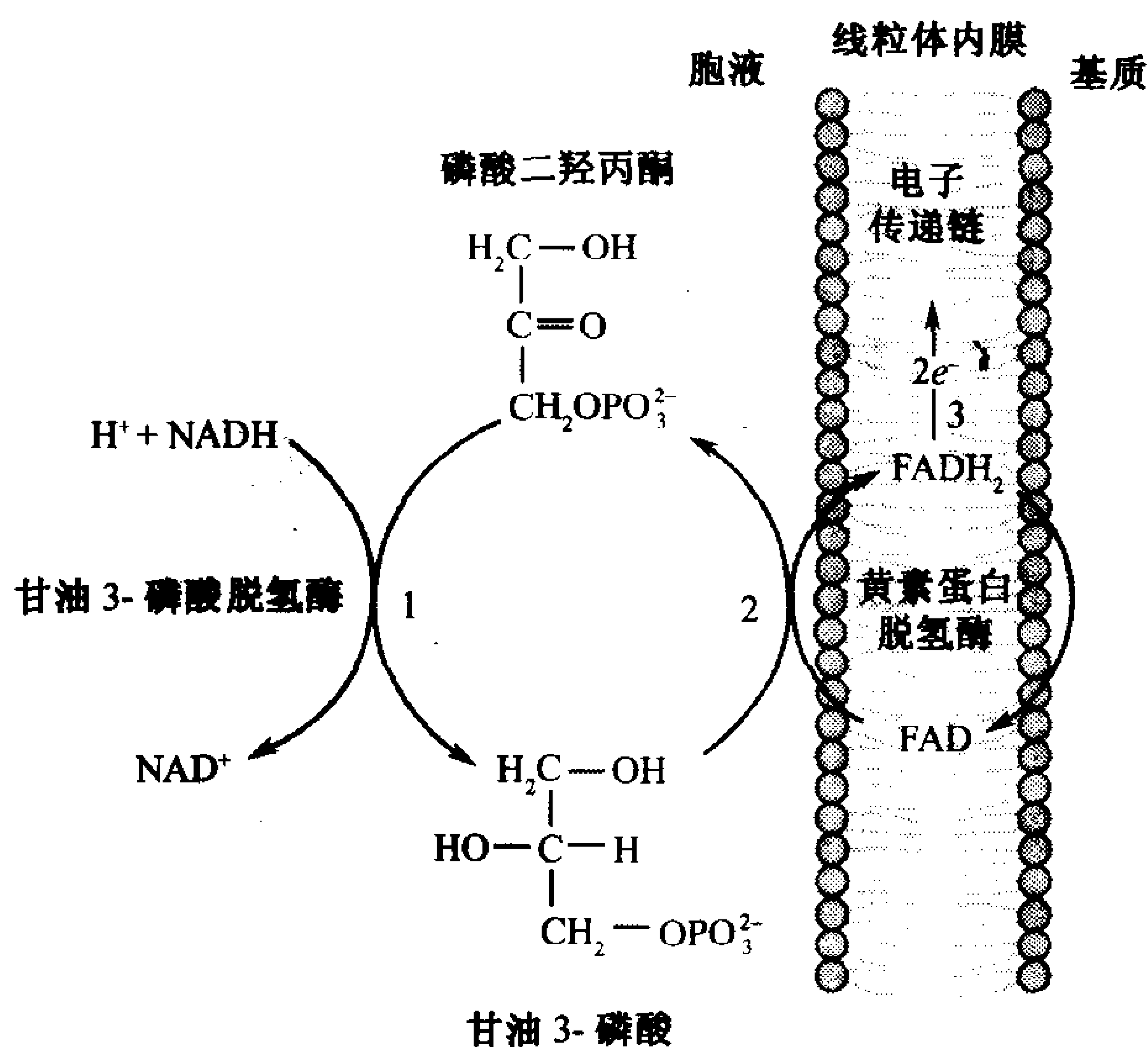


图 17-4 甘油磷酸穿梭

胞浆 NADH 的电子通过三步反应传递到线粒体的电子传递链(用红色表示传氢体):(1)在甘油 3-磷酸脱氢酶催化下NADH被磷酸二羟丙酮进行胞浆氧化。(2)黄素蛋白脱氢酶催化甘油3-磷酸氧化,同时FAD还原成 $FADH_2$。(3)伴随电子进入电子传递链,$FADH_2$ 重新氧化。

ADP-ATP 移位体

在线粒体基质中通过氧化磷酸化产生的 ATP 大部分在胞质中被利用。线粒体内膜含有一种 **ADP-ATP 转位蛋白**(也称**腺苷酸移位酶**),它将 ATP 运出基质,并交换进来胞质中经 ATP 水

解产生的 ADP。

ADP-ATP 转位蛋白是由两个相同的 30kDa 的亚基组成的二聚体，有一个供 ADP 和 ATP 竞争结合的位点。它有两种主要构象：一种构象是 ATP-ADP 结合位点朝向线粒体内侧，另一种是该位点朝向外侧(图 17-5)。这种转位蛋白必须与配体结合，才能以一种合理的生理速率从一种构象转换成另一种构象。在这一点上，它不同于葡萄糖转运体(图 10-35)，后者不需配体就可以改变构象。由于 ATP^{4-} 的输出和 ADP^{3-} 的输入，导致每个转运循环输出一个负电荷。这种**电学上的**(electrogenic)对输是由跨线粒体内膜(外侧带正电)的膜电位差 $\Delta\Psi$ 驱动，是跨膜质子梯度导致的结果。

496

在基质中合成 ATP 所需的 P_i 是通过 P_i-H^+ 同向转运系统从细胞质输入的。由线粒体内膜

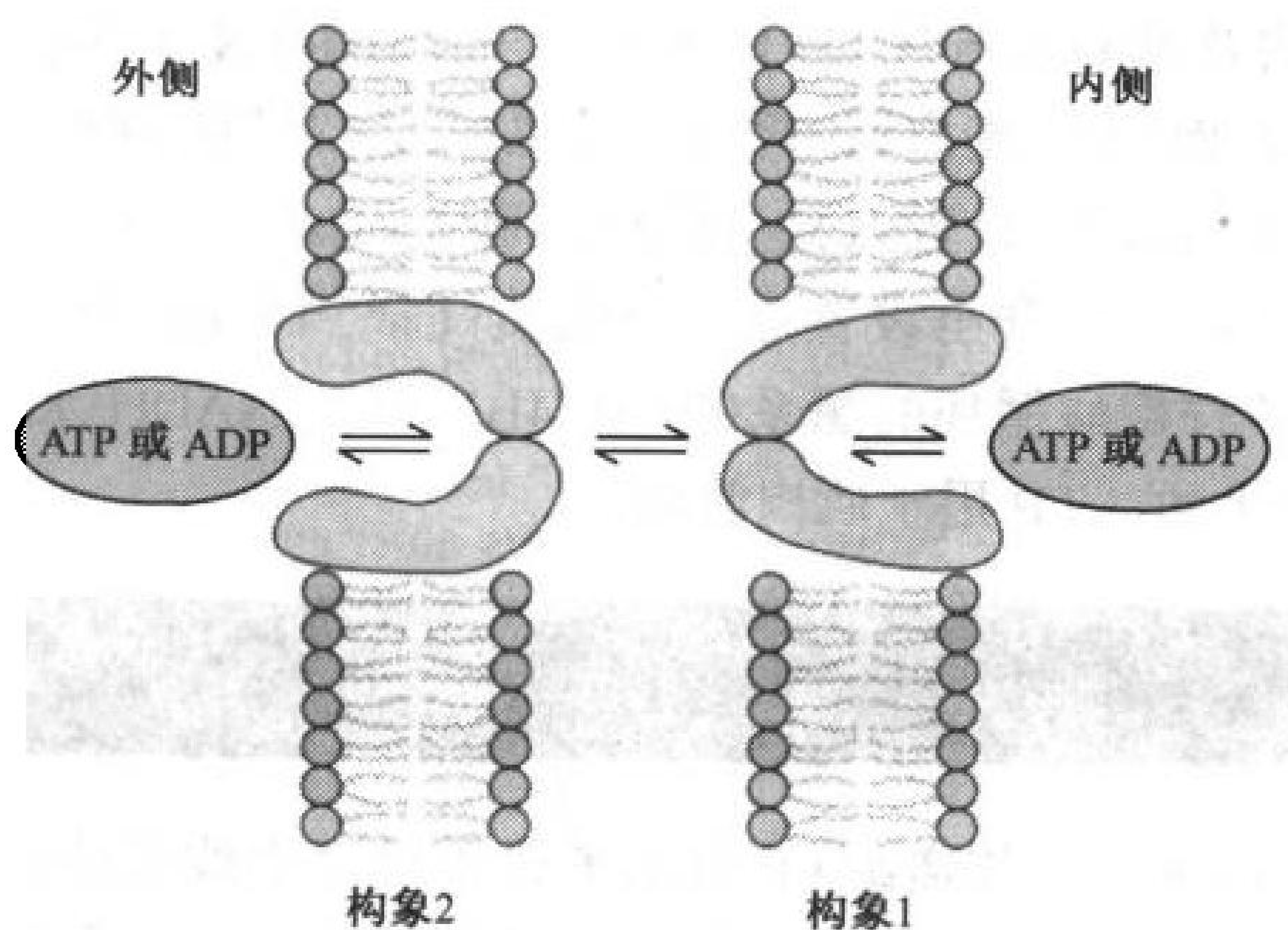


图 17-5　ADP-ATP 转位蛋白的构象机制

位于转位蛋白二聚体的亚基接触区域的腺苷酸结合部位被交替地暴露于膜的两侧面。

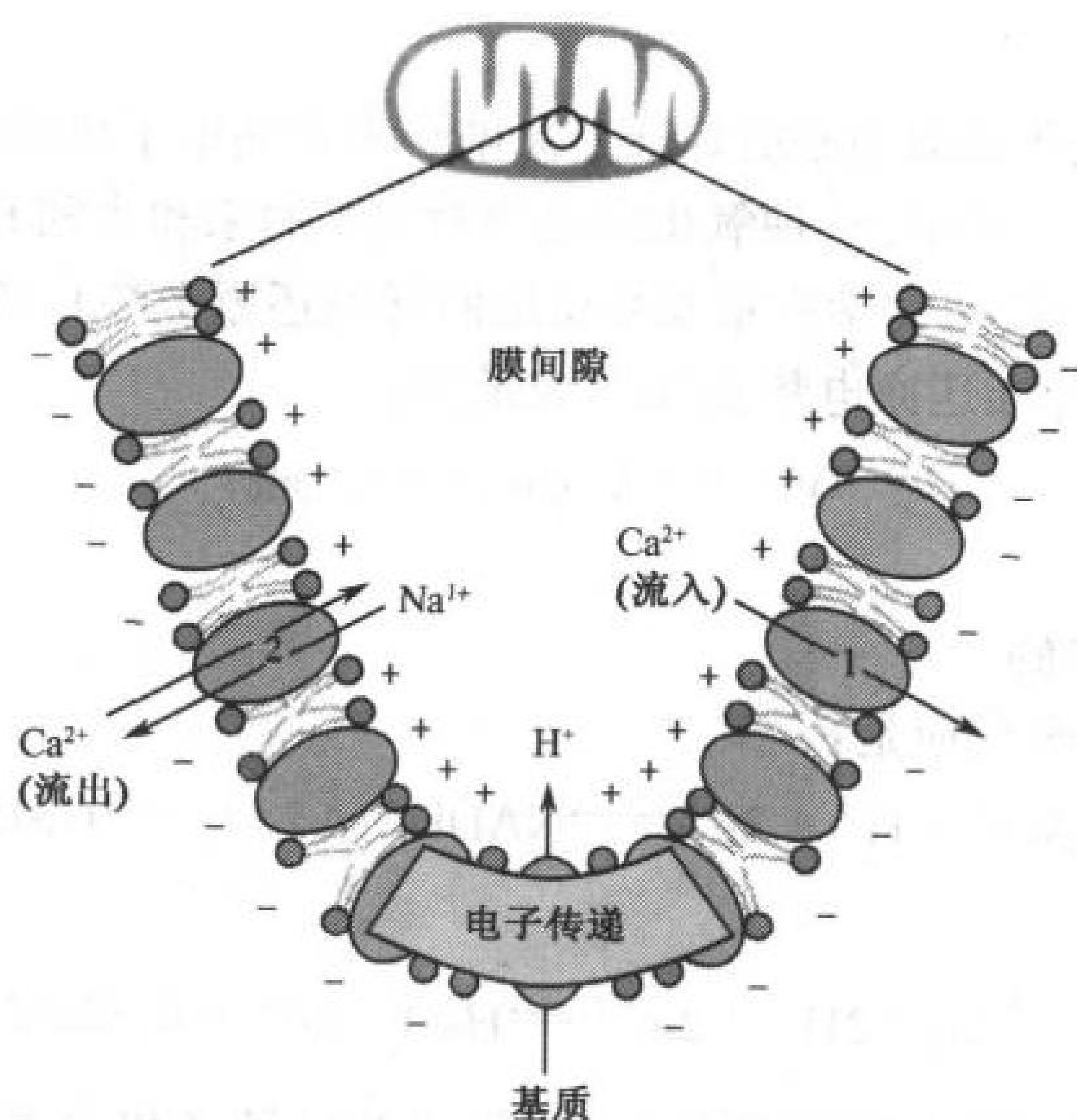


图 17-6　线粒体的两个 Ca^{2+} 转运系统

系统 1 根据膜电位(内负)介导 Ca^{2+} 流入基质，系统 2 介导 Ca^{2+} 流出线粒体与 Na^+ 交换。

电子传递机制产生的跨膜质子梯度，不但为 ATP 合成提供热力学驱动力（节 17-3），还驱动该过程所需原料 ADP 和 P_i 的转运。

Ca^{2+} 转运

线粒体内膜有分别控制 Ca^{2+} 流入和流出的系统（图 17-6）。Ca^{2+} 的流入由吸引阳离子的膜电位（$\Delta\Psi$，内侧带负电）驱动，流入速率随外部[Ca^{2+}]而变化，因为该系统转运 Ca^{2+} 的 K_M 大于细胞质 Ca^{2+} 的浓度。

只有与 Na^+ 交换时，Ca^{2+} 才能离开基质（反向转运）。这一交换过程通常以其最大速率进行。因此线粒体（以及内质网和肌质网）可作为胞质中 Ca^{2+} 的缓冲库：当胞质中[Ca^{2+}]升高时，线粒体的 Ca^{2+} 流入增加，而 Ca^{2+} 流出保持恒定，结果形成 Ca^{2+} 的净流入。于是线粒体[Ca^{2+}]升高，而胞质[Ca^{2+}]降至初始水平（设置点）。相反地，胞质[Ca^{2+}]降低，使流入减少，造成 Ca^{2+} 从线粒体中净流出，胞质[Ca^{2+}]回升至设置点。当胞质[Ca^{2+}]升高（例如肌肉活力增加）时，基质[Ca^{2+}]也升高，从而激活柠檬酸循环的酶系（节 16-4B），导致 NADH 水平升高，NADH 通过线粒体电子传递链再氧化产生的 ATP 用于肌肉收缩。

497

2. 电子传递

将电子由 NADH 和 $FADH_2$ 传递给 O_2 的电子载体结合于线粒体内膜上。这些氧化还原中心的一部分是可移动的，另一部分则是膜整合蛋白复合体的组分。电子传递体的顺序大致按照它们的相对还原电势大小排列，使整个电子传递过程是放能的。在这一节，我们首先讨论电子传递的热力学，然后研究各个电子传递体的分子特性。

A. 电子传递的热力学

我们可以通过检查氧化还原中心的标准还原电势来评估电子传递的热力学效率。当我们从热力学角度考虑氧化还原反应时，一种氧化型底物对电子的亲和力随其标准还原电势 $\mathscr{E}^{\circ\prime}$ 的增加而增加（表 13-13 列出了一些生物学中重要半反应的标准还原电势）。对于一个包含任意两个半反应的氧化还原反应，其标准还原电势差 $\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime}$ 表示为：

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(e^-\text{受体})} - \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(e^-\text{供体})}$$

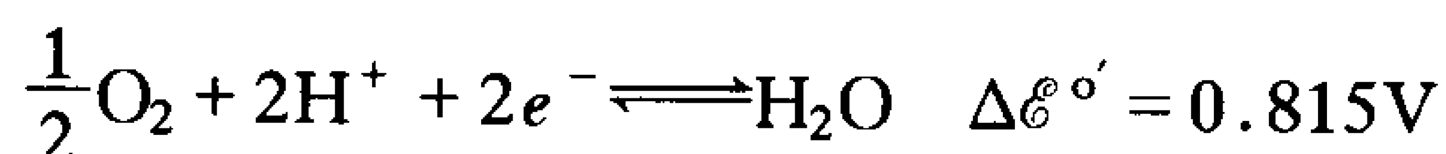
NADH 氧化反应是高放能的

NADH 被 O_2 氧化的半反应是：



$$NAD^+ + H^+ + 2e^- \rightleftharpoons NADH \quad \Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = -0.315V$$

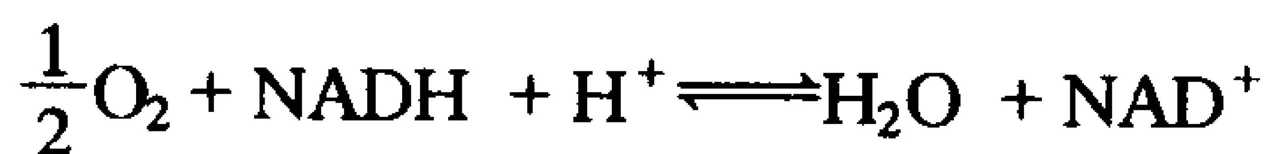
和



$$\frac{1}{2}O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O \quad \Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = 0.815V$$

498

因为 O_2/H_2O 半反应具有更高的标准还原电势，因而对电子亲和力更大，而 NADH 半反应是反向的，所以在这一偶联反应中 NADH 是电子供体而 O_2 是电子受体。整个反应是：



$$\frac{1}{2}O_2 + NADH + H^+ \rightleftharpoons H_2O + NAD^+$$

从而

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ'} = 0.815\text{V} - (-0.315\text{V}) = 1.130\text{V}$$

由公式 13-6 可以计算出该反应的标准自由能变化：

$$\Delta G^{\circ'} = -n\text{F}\Delta\mathscr{E}^{\circ'}$$

对于 NADH 氧化，$\Delta G^{\circ'} = -218\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$。换言之，在标准生化条件下，1mol NADH 被 O_2 氧化（转移 2mol 电子）伴随释放 218kJ 自由能。

因为由 ADP 和 P_i 合成 1mol ATP 所需的自由能是 $30.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$，所以，NADH 被 O_2 氧化的反应理论上可以驱动形成若干摩尔 ATP。在线粒体中，NADH 氧化与 ATP 合成的偶联是通过电子传递链实现的，电子在其中传递时经过三个蛋白复合体。由此全部自由能变化分成三小份，每一份通过氧化磷酸化为 ATP 合成提供能量。氧化 1 分子 NADH 大约产生 3 分子 ATP（在后面我们将会看到为什么它们之间不是严格的化学计量关系）。因此在标准生化条件，氧化磷酸化的热力学效率为 $3\times30.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}\times100/218\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1} = 42\%$。然而在生理条件下，一个活性的线粒体（其中的反应物和产物的浓度以及 pH 都不同于标准状况）的热力学效率约是 70%。相比之下，一台典型汽车引擎的能量效率小于 30%。

B. 电子传递的顺序

NADH 和 $FADH_2$ 的氧化通过电子传递链进行。电子传递链由一组含有氧化还原中心的蛋白复合体组成，这些氧化还原中心对电子的亲和力逐渐增大（标准还原电势不断增加）。电子在

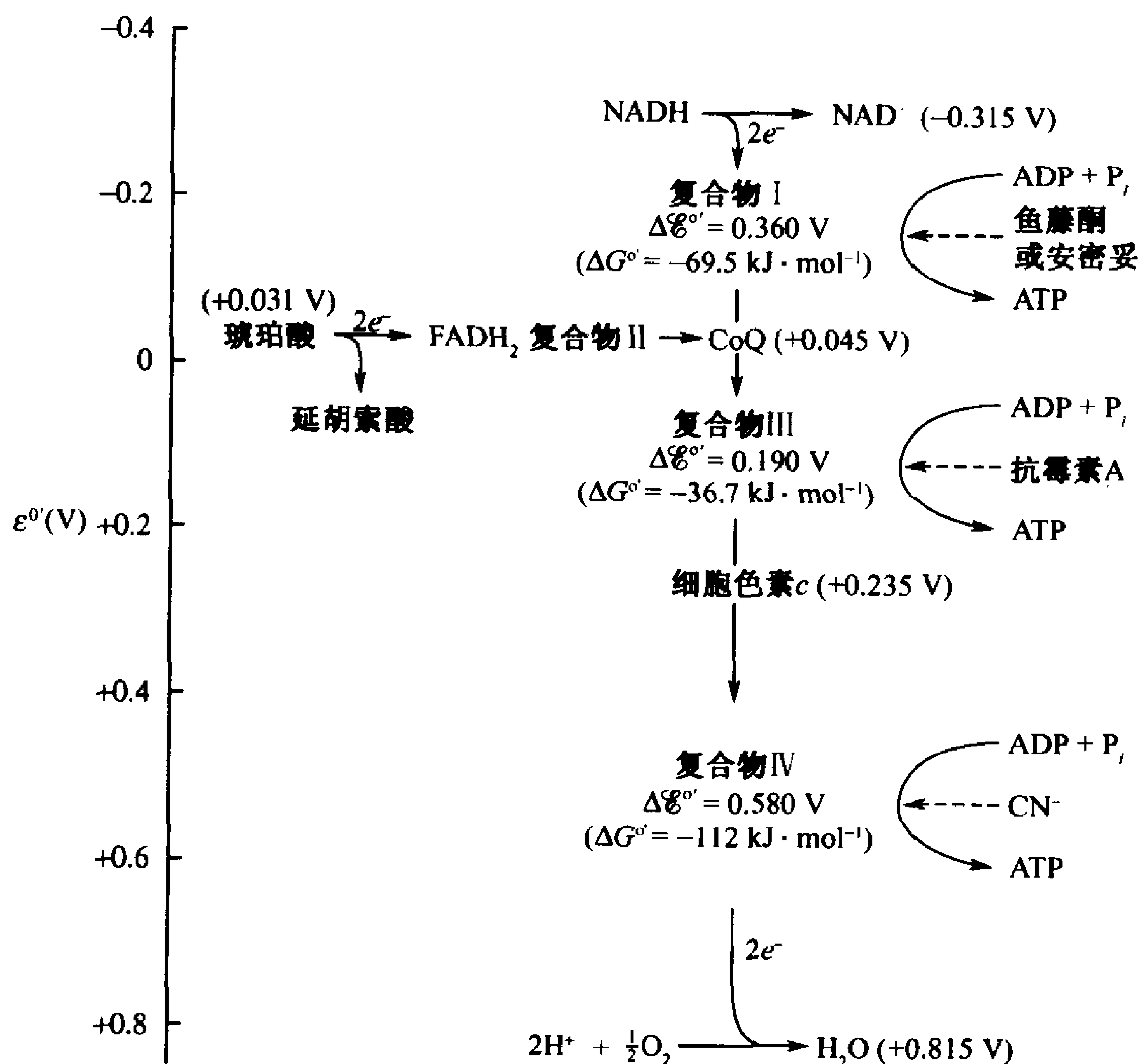
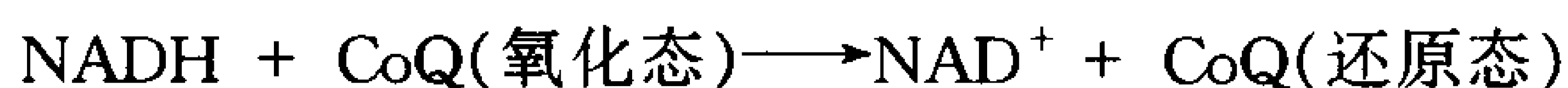


图 17-7　纵览线粒体的电子传递

线粒体的大多数流动组分（绿）的标准还原电位被注明，并指明了能释放足够自由能合成 ATP 的部位（蓝）和几种呼吸抑制剂的作用部位（红）。复合物 I、III 和 IV 不能直接合成 ATP，但能蓄合通过将质子泵出线粒体外形成质子梯度所产生的，合成 ATP 所必需的自由能。

这条标准还原电势由低到高的传递链上传递(图 17-7)。**辅酶 Q**(CoQ, 又称**泛醌**, 因其在生物中普遍存在而得名)将电子从**复合体I** 和复合体II 传递给**复合体III**, 然后外周膜蛋白细胞色素 *c* 再将电子从复合体 III 传递给**复合体IV**。

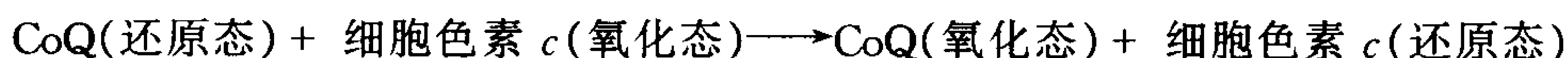
复合体 I 催化 CoQ 氧化 NADH



$$\text{NADH} + \text{CoQ(氧化态)} \longrightarrow \text{NAD}^+ + \text{CoQ(还原态)}$$

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = 0.360\text{V} \quad \Delta G^{\circ\prime} = -69.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

复合体 III 催化细胞色素 *c* 氧化 CoQ(还原态):

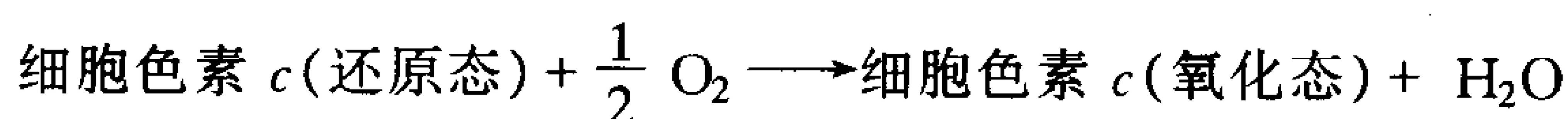


$$\text{CoQ(还原态)} + \text{细胞色素}\ c\text{(氧化态)} \longrightarrow \text{CoQ(氧化态)} + \text{细胞色素}\ c\text{(还原态)}$$

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = 0.190\text{V} \quad \Delta G^{\circ\prime} = -36.7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

复合体 IV 催化电子传递过程的终端电子受体 O_2 氧化还原态的细胞色素 *c*

499

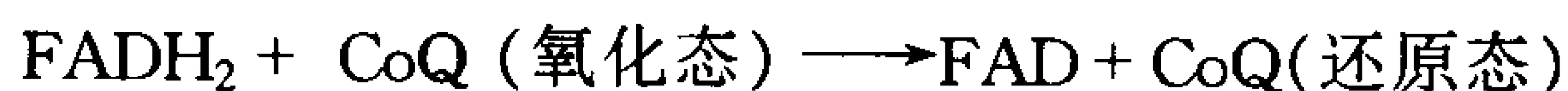


$$\text{细胞色素}\ c\text{(还原态)} + \frac{1}{2}\ O_2 \longrightarrow \text{细胞色素}\ c\text{(氧化态)} + H_2O$$

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = 0.580\text{V} \quad \Delta G^{\circ\prime} = -112\ \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

当一对电子相继经过复合体 I、III 和 IV 时, 每一步都释放出足以合成一分子 ATP 的自由能。

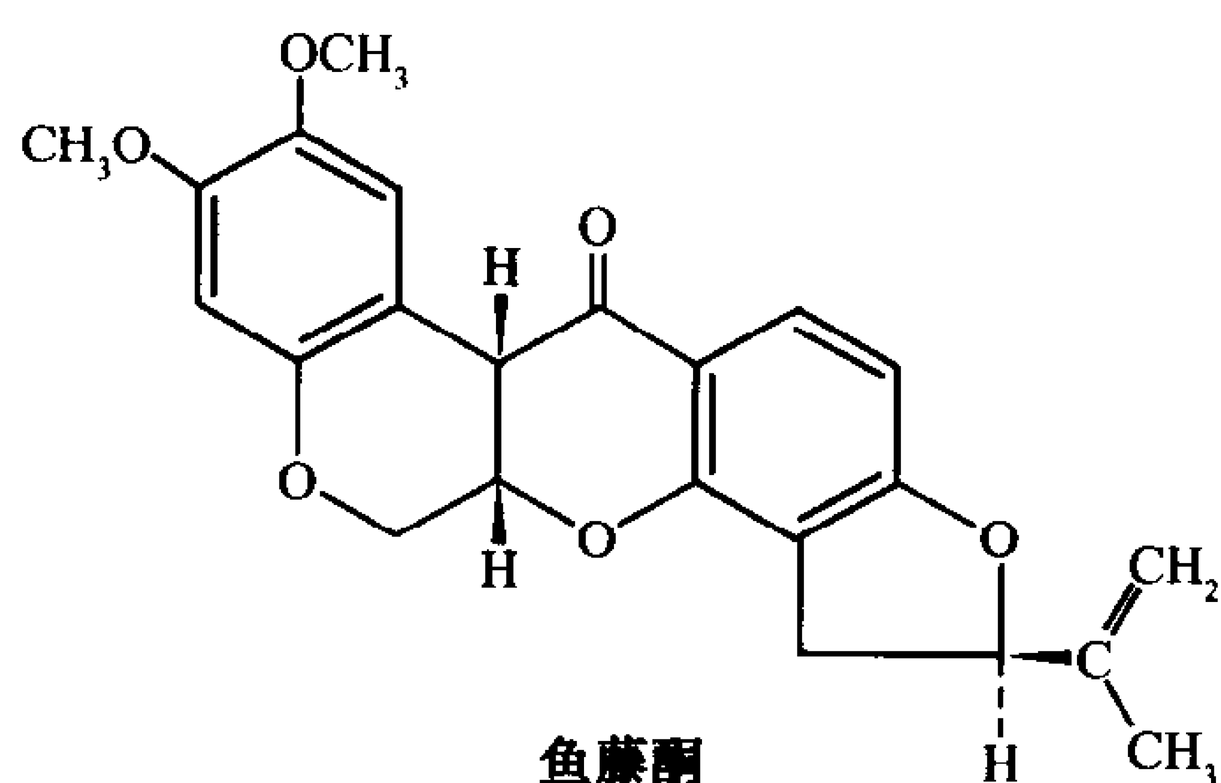
复合体 II 催化 CoQ 氧化 $FADH_2$:



$$\text{FADH}_2 + \text{CoQ (氧化态)} \longrightarrow \text{FAD} + \text{CoQ(还原态)}$$

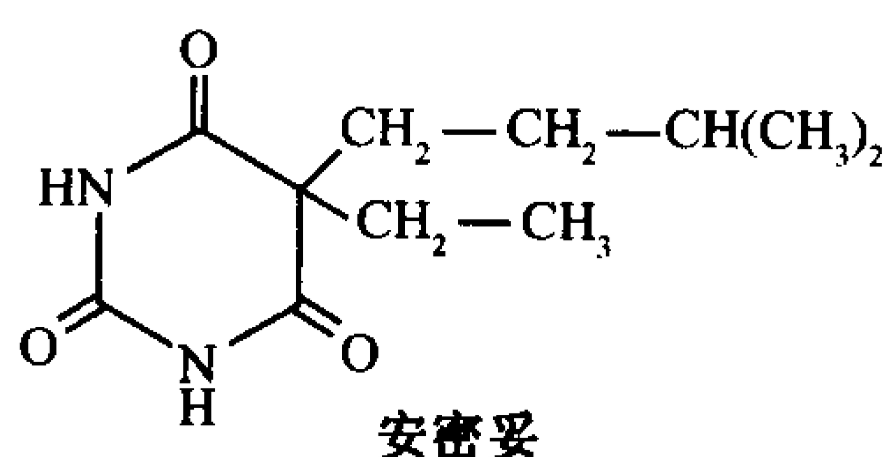
$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = 0.085\text{V} \quad \Delta G^{\circ\prime} = -16.4\ \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

这一氧化还原反应释放的能量不足以合成 ATP, 其作用仅是将电子由 $FADH_2$ 注入电子传递链。

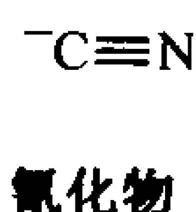


鱼藤酮

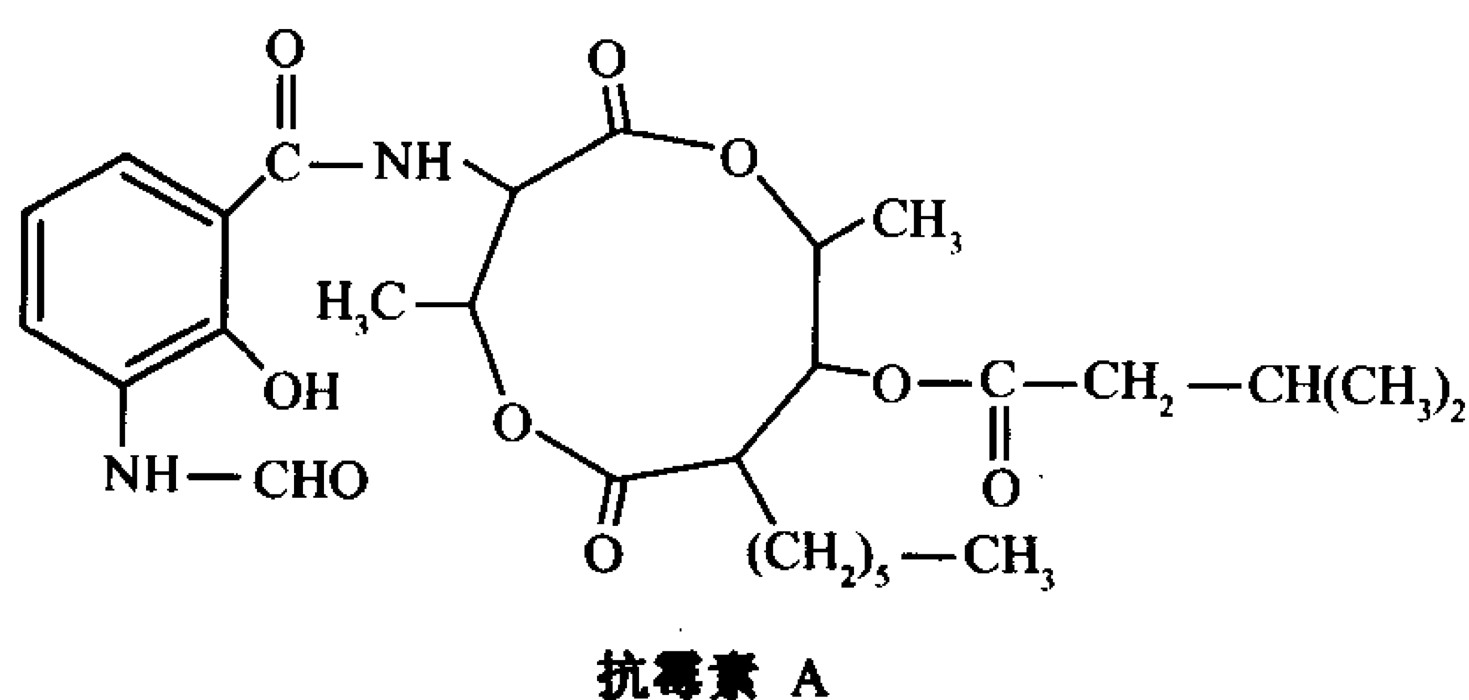
500



安密妥



氰化物



抗霉素 A

抑制剂揭示电子传递链的作用方式

通过使用特异的抑制剂基本阐明了电子传递中各个事件发生的顺序, 随后经测量各个氧化还原组分的标准还原电势得以证实。线粒体悬浮液中 O_2 的消耗速率是电子传递链活性的敏感量度。通过测定对 O_2 消耗率的影响, 证实能够阻断电子传递的化合物包括: **鱼藤酮**(rotenone, 亚马逊河流域的印第安人用来毒死鱼类的一种植物毒素, 也可以作为杀虫剂)、**安密妥**(amytal, 一种巴比妥盐)、**抗霉素 A**(antimycin A, 一种抗生素)和**氰化物**(cyanide)。

将鱼藤酮或安密妥加入线粒体悬浮液将阻断复合体 I 中的电子传递; 抗霉素 A 阻断复合体 III 中的; 而 CN^- 阻断复合体 IV 中的电子传递(图 17-7)。这些抑制剂也都阻止 O_2 的消耗。当加入一种其电子可进入阻断点下游电子传递链的物质时, O_2 的消耗得以恢复。例如, 将琥珀酸加入

鱼藤酮阻断的线粒体，电子传递和 O_2 消耗都得到恢复。这样，用电子传递抑制剂实验揭示了电子从各种底物进入电子传递链的入口位点。

电子传递链上的 4 个呼吸复合体都由若干结合有不同氧化还原辅基的蛋白质组成，这些氧化还原辅基的还原电势逐步升高(表 17-1)。这些复合体都可以在线粒体内膜上侧向移动，但是似乎不能形成任何稳定的高级结构。实际上，它们并不以等摩尔量存在。下面我们将研究这些复合体的结构和在它们之间传递电子的分子。它们的相互关系总结于图 17-8。

表 17-1　静息态线粒体中电子传递链组分的还原电势

组分	$\mathscr{E}^{o'}$/V
NADH	−0.315
复合物 I(NADH-CoQ 还原酶;850 kDa,43 亚基);	
FMN	?
(Fe-S)N-1a	−0.380
(Fe-S)N-1b	−0.250
(Fe-S)N-2	−0.030
(Fe-S)N-3,4	−0.245
(Fe-S)N-5,6	−0.270
琥珀酸	0.031
复合物 II(琥珀酸 CoQ 还原酶;127 kDa,5 亚基);	
FAD	−0.040
(Fe-S)S-1	−0.030
(Fe-S)S-2	−0.245
(Fe-S)S-3	0.060
细胞色素 b_{560}	−0.080
辅酶 Q	0.045
复合物 III(CoQ-细胞色素 *c* 还原酶;248 kDa,11 亚基);	
细胞色素 $b_H(b_{562})$	0.030
细胞色素 $b_L(b_{566})$	−0.030
(Fe-S)	0.280
细胞色素 c_1	0.215
细胞色素 *c*	0.235
复合物 IV(细胞色素 *c* 氧化酶;~200 kDa,6−13 亚基);	
细胞色素 *a*	0.210
Cu_A中心	0.245
Cu_B	0.340
细胞色素 a_3	0.385
O_2	0.815

引自 Wilson, D. F., Erecinska, M., and Dutton, P. L., Annu, Rev, Biophys. Bioeng. 3, 205 and 208(1974); and Wilson, D. E., In Bittar, E. E. (Ed.), Membrane Structure and Function, Vol. 1, p. 160, Wiley(1980)。

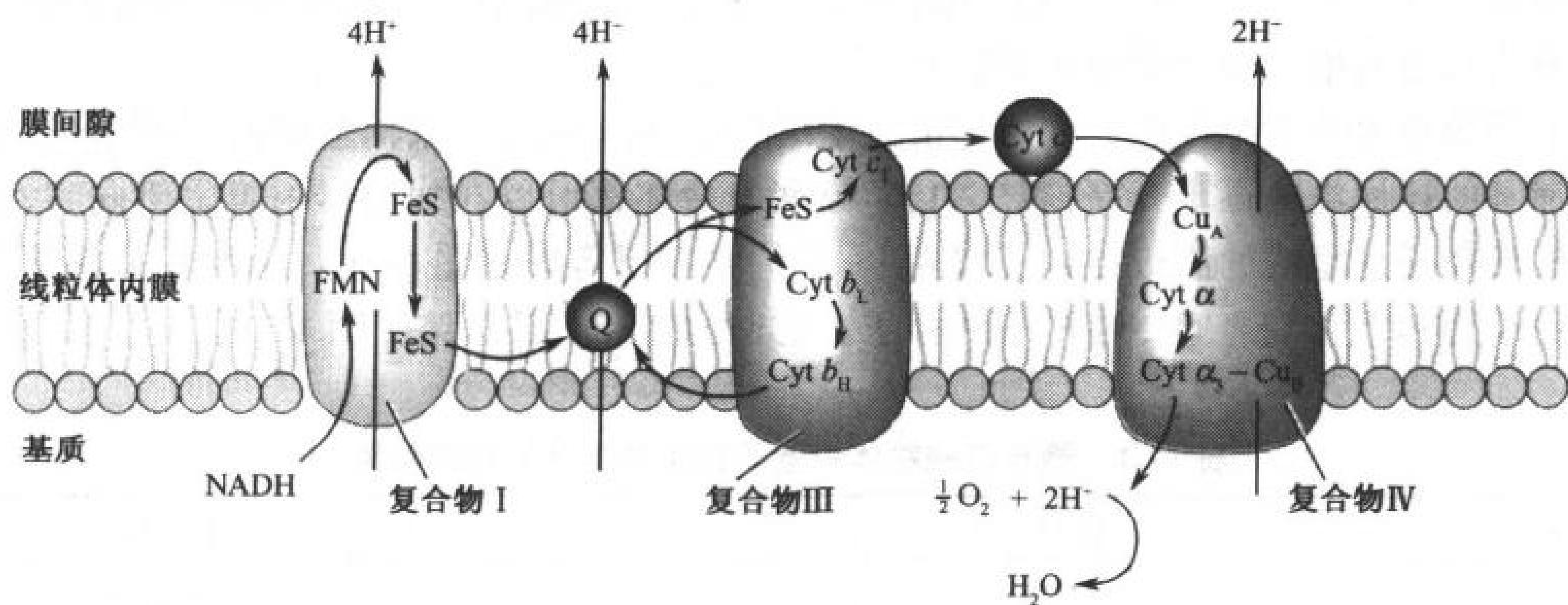


图 17-8 *功能的秘诀*：线粒体的电子传递链

该图显示电子传递(黑)和质子传递(红)的途径。电子在复合物 I 和 III 之间被膜溶性辅酶 Q(Q)传递。在复合物 III 和 IV 之间被外周膜蛋白细胞色素 *c* 传递。复合物 II(没有标明)将电子从琥珀酸传递到辅酶 Q。

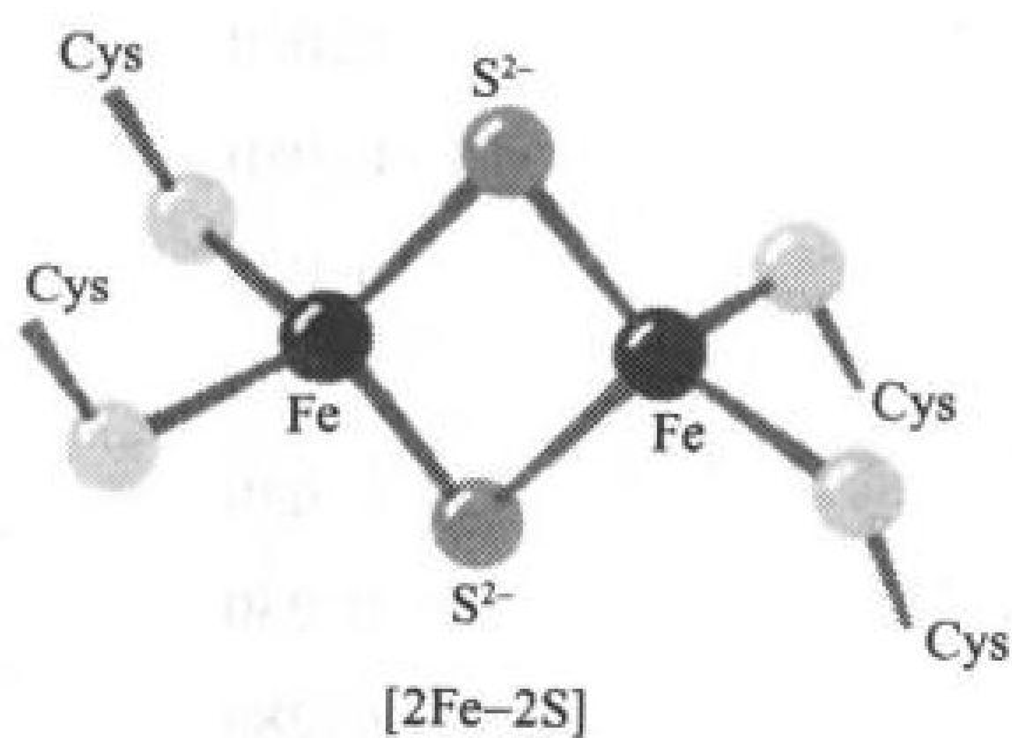
C. 复合体 I(NADH-辅酶 Q 氧化还原酶)

502

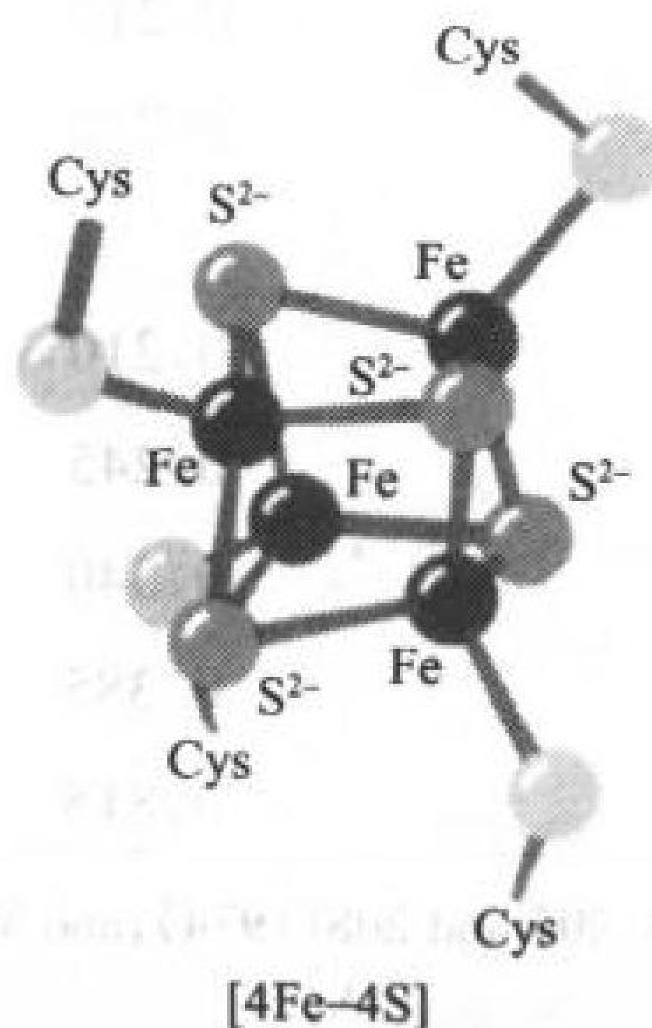
复合体 I(将电子由 NADH 传递给 CoQ)可能是线粒体内膜上最大的蛋白质复合体，含有 43 条肽链，总相对分子质量为 850 kDa。它含有一分子**黄素单核苷酸(FMN**，一种具有氧化还原活性的辅基，与 FAD 的区别仅在于缺少一个 AMP 基团)和 6～7 个**铁-硫簇**(iron-sulfur cluster)。铁-硫簇也参与电子传递。

复合体I 的辅酶

铁-硫簇是**铁-硫蛋白**(亦称**非血红素铁蛋白**)的辅基，主要有两种类型，表示为**[2Fe-2S]簇**和**[4Fe-4S]簇**（见左图)，它们都含有相同数量的铁原子和硫离子，并且都与 4 个蛋白质半胱氨酸的巯基配位。注意在这两类铁硫簇中，铁原子都分别与 4 个硫原子配位，后者围绕铁原子几乎呈四面体排列。细菌的**铁氧还蛋白**(ferredoxin)包含 2 个[4Fe-4S]簇(图 17-9)。



[2Fe-2S]



[4Fe-4S]

铁-硫簇可以进行单电子的氧化和还原。*所有铁-硫簇的氧化态、还原态都只相差 1 个电荷，而与所含铁原子数无关*。这是因为每种簇中的铁原子形成一个共轭体系，因而使单个铁原子有可能处于 +2 价与 +3 价之间的氧化态。

FMN 和 CoQ 均可以有 3 种氧化态形式(图 17-10)。它们可以接受或提供 1 个或 2 个电子。这是因为它们的半醌式结构是稳定的[这些半醌是稳定的**自由基**(free radical)，分子带有非配对电子]。FMN 紧密地结合于蛋白上，而 CoQ 因其有一个疏水性的尾部，在线粒体内膜的脂双层中是可溶性的。在哺乳动物中，这一尾部含有 10 个五碳的类异戊二烯单元，因

而该辅酶表示为 Q_{10}。在其他生物中，CoQ 可能有 6 个(Q_6)或 8 个(Q_8)类异戊二烯单元。

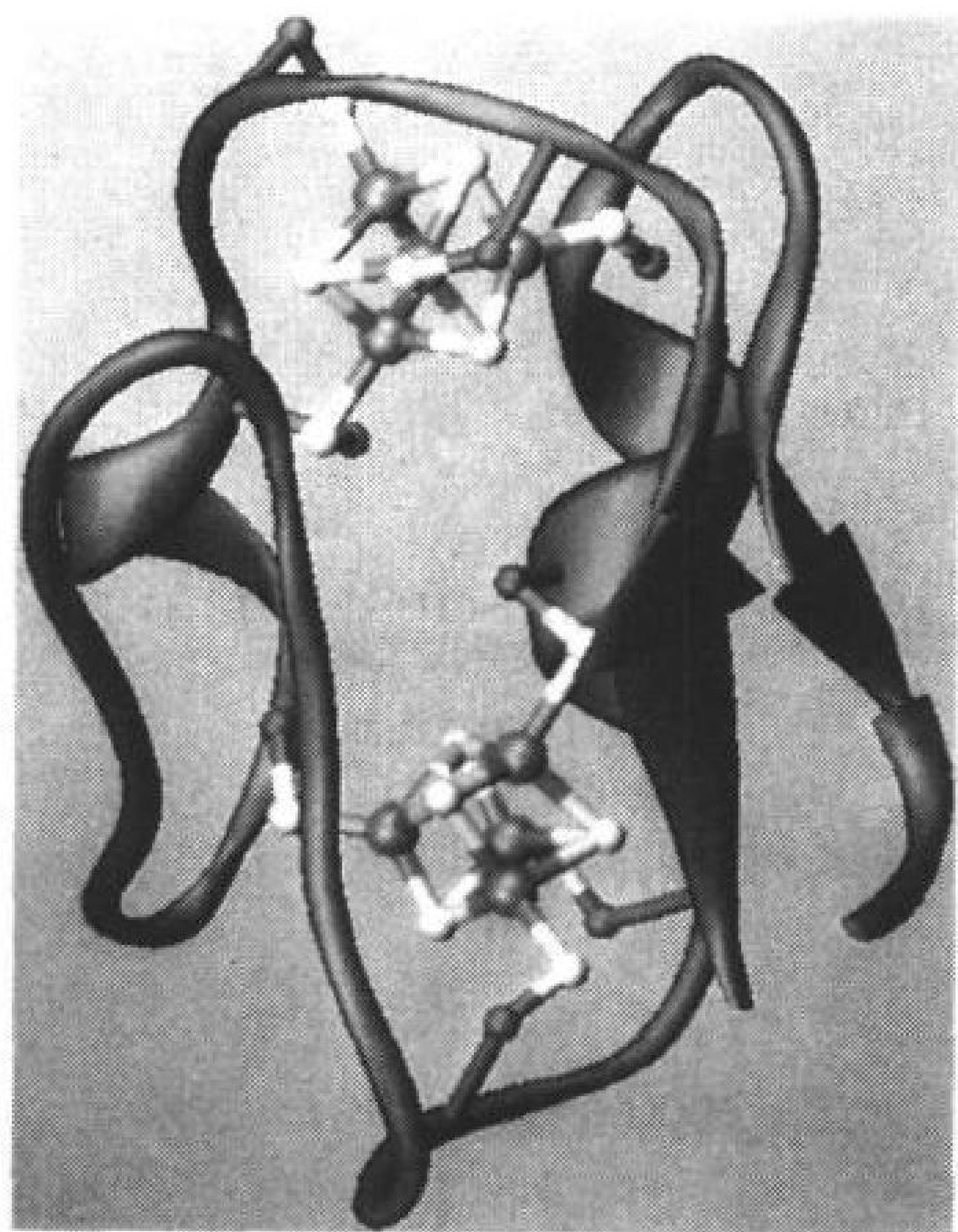


图 17-9 来自 *Peptococcus aerogenes* 的铁氧还蛋白的 X 射线结构图

该 54 个残基的单链蛋白含有两个[4Fe-4S]簇。与每个簇配位的 4 个半胱氨酸残基的 $C_β$ 原子(绿色)；铁原子(褐色)；硫原子(黄色)。(引自 an X-ray structure by Elinor Adman, Larry Sieker, and Lyle jensen, University of Wasington)

复合体I 中的电子传递

根据复合体 I 中各个氧化还原中心的还原电势(表 17-1)，推测电子从 NADH 传递到 CoQ 是逐级发生的。该过程包括每一基团结合电子时的瞬时还原和将电子传给下一基团时的重新氧化。电子传递的确切顺序还不清楚，部分是因为还原当量在铁-硫簇中的分配速度似乎快于它们由 NADH 提供的速度。

NADH 只能参与双电子传递反应。相反，复合体 III(见下文)的细胞色素(还原态的 CoQ 将电子传给它们)只能进行单电子反应。FMN 和 CoQ 一次可以传递 1 个或 2 个电子，因而在双电子供体 NADH 和单电子受体细胞色素之间形成一条电子通路。

质子的转运

当电子在复合体 I 的氧化还原中心之间传递时，4 个质子由基质运送到膜间隙。由 NADH 提供的质子的命运是不确定的：它们可能被泵出膜外，也可能用来将 CoQ 还原为氢醌形式 $CoQH_2$。复合体 I 中的质子泵机理尚未完全明了，但几乎可以肯定它是由蛋白质的氧化还原状态改变引起的构象变化所驱动(图 17-11)。

细菌视紫红质(盐杆菌的一种膜整合蛋白，含有 7 个跨膜螺旋片段)(节 10-1A)提供了一个由构象变化引发质子泵的模型。细菌视紫红质是一种光驱动的质子泵：通过其视黄醛辅基吸收光能获得泵质子的自由能。细菌视紫红质的构象可在两种状态之间变化，处于膜内侧的质子与一种构象的蛋白结合，当蛋白质构象改变时，质子被运送至膜外侧释放。细菌视紫红质的构象变化是由视黄醛吸收光触发的构象改变引起的。对这个相对较小的蛋白质(26kDa)的研究证实了一个理论，即一个位点(光吸收基团)发生的分子事件可以影响整个蛋白质的结构。在大得多的复合体 I 中，质子结合基团及其与氧化还原中心的关系还有待确认。

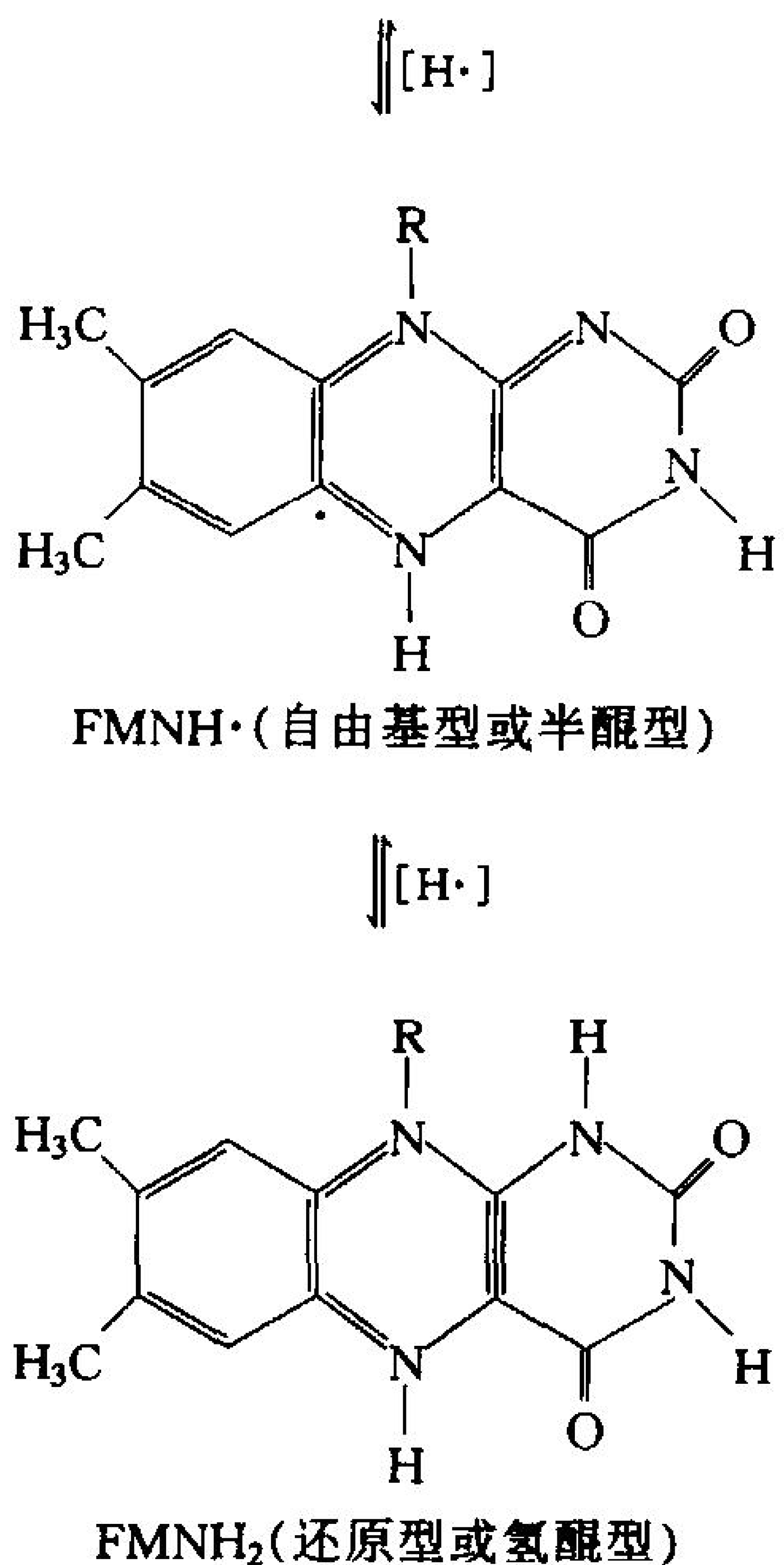
504

(a)

黄素单核苷酸(FMN)
(氧化型或醌型)

(b)

辅酶 Q(CoQ)或泛醌
(氧化型或醌型)



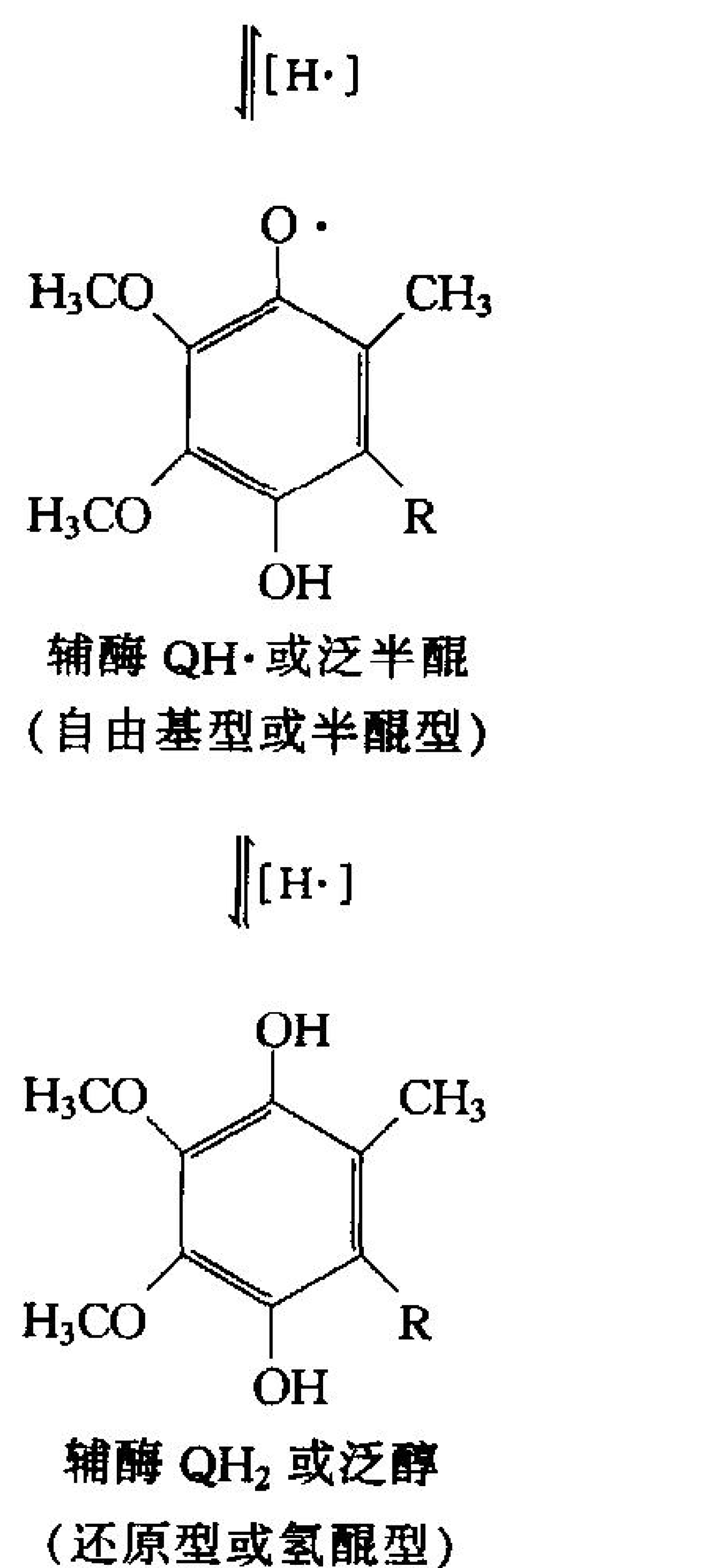


图 17-10　FMN 和辅酶 Q 的氧化状态

FMN(a)和辅酶 Q(b)均形成稳定的处于自由基状态的半醌。

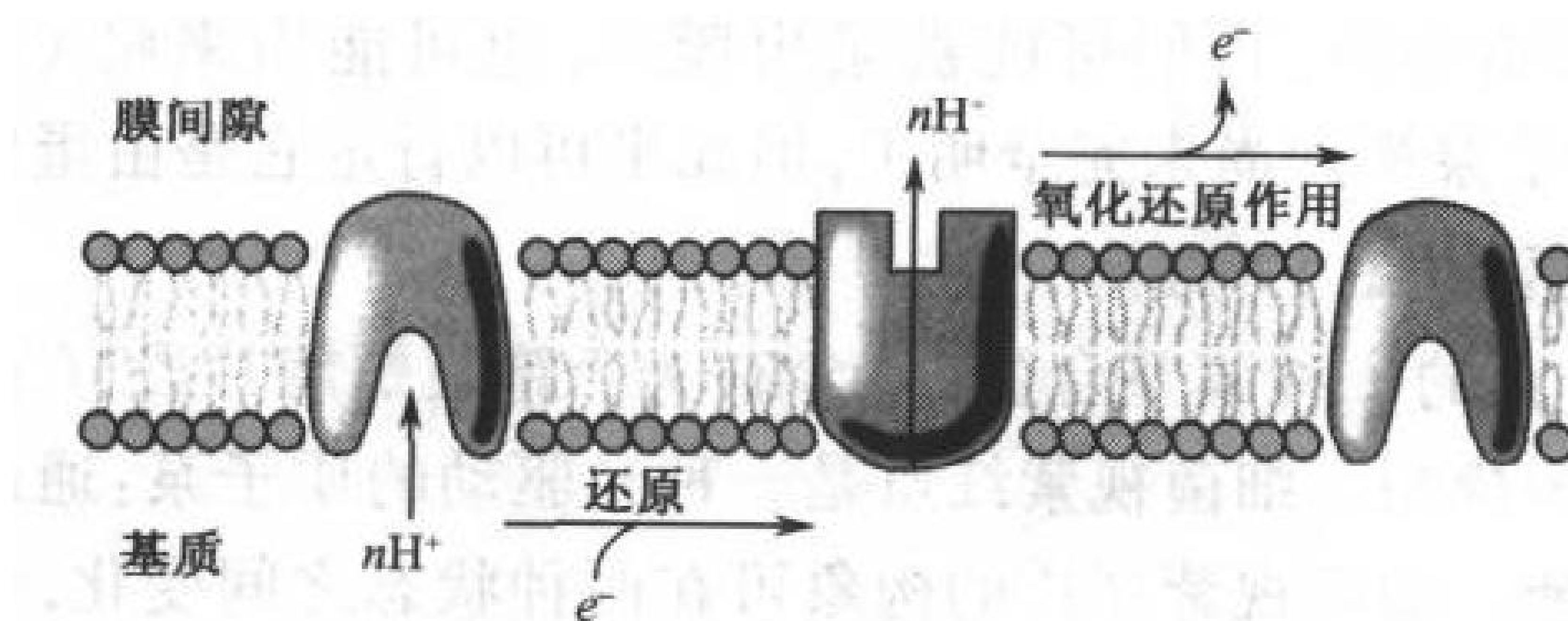


图 17-11　联系电子传递的质子泵模型

在氧化构象时,质子与膜的基质面的氨基酸侧链结合。还原时构象改变,质子化基团暴露于膜的胞浆面并降低其 pK 值,引起质子解离。再氧化后恢复至原来的构象。在复合物 I 中,每传递由 NADH 提供的 1 对电子将把 4 个质子泵过线粒体内膜。

D. 复合体 II(琥珀酸-辅酶 Q 氧化还原酶)

含有柠檬酸循环酶-琥珀酸脱氢酶(节 16-3F)和其他 3 种小的疏水亚基的复合体 II 将电子从琥珀酸传递给 CoQ。它的氧化还原基团包括与琥珀酸脱氢酶共价结合的 FAD(图 16-12)(电子首先传给它)、1 个[4Fe-4S]簇、2 个[2Fe-2S]簇和 1 个**细胞色素 b_{560}**(细胞色素在框 17-1 中讨论)。

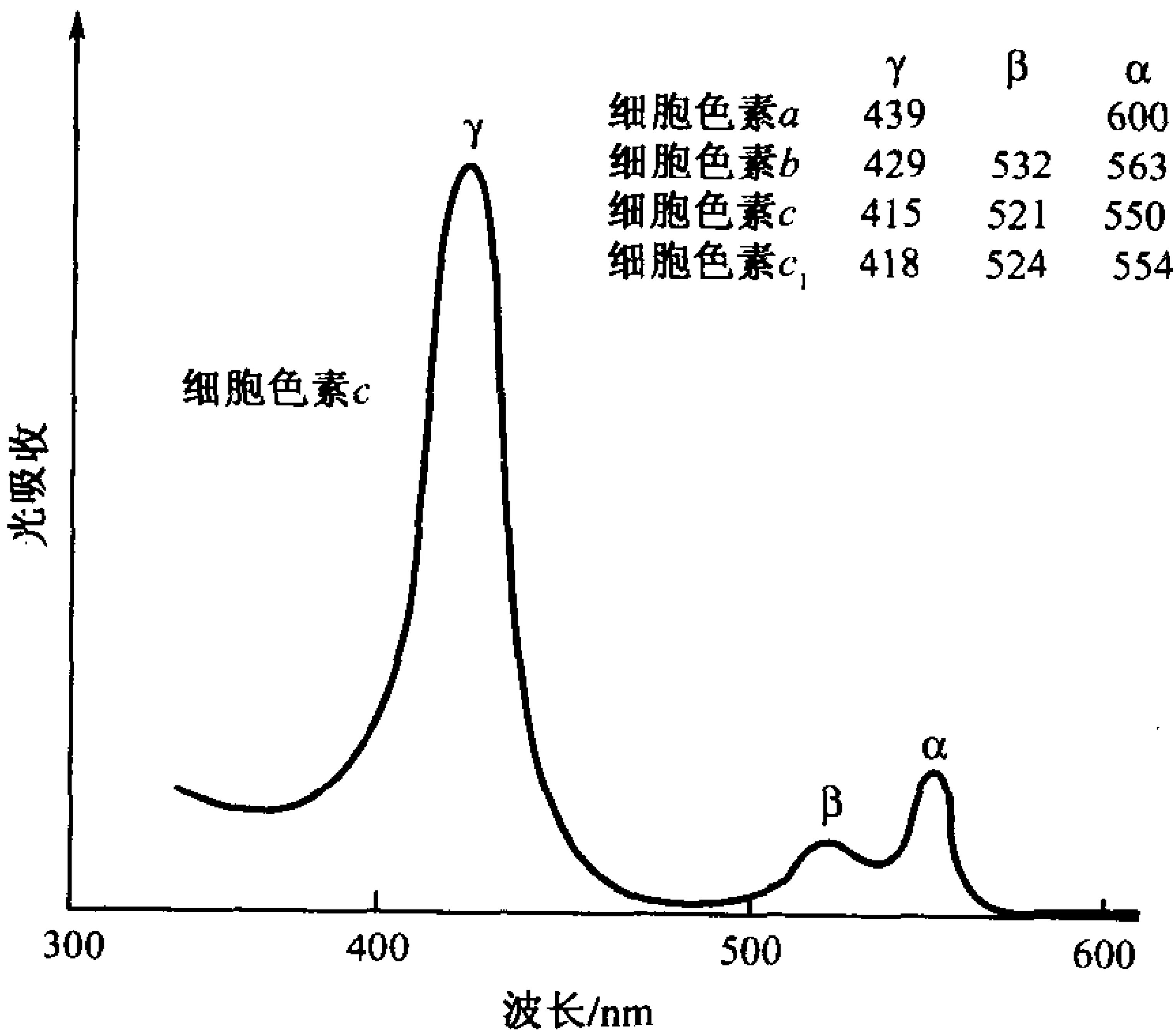
505

框 17-1　生物化学焦点

细胞色素是传递电子的血红素蛋白

David Keilin 在 1925 年首先阐明了细胞色素的功能。细胞色素是一类存在于除少数专性的厌氧生物外的所有有机体中的氧化还原蛋白。它们都含有血红素基团,在电子传递过程中,血红素基团发生 Fe(II)和 Fe(III)氧化态间的转换。

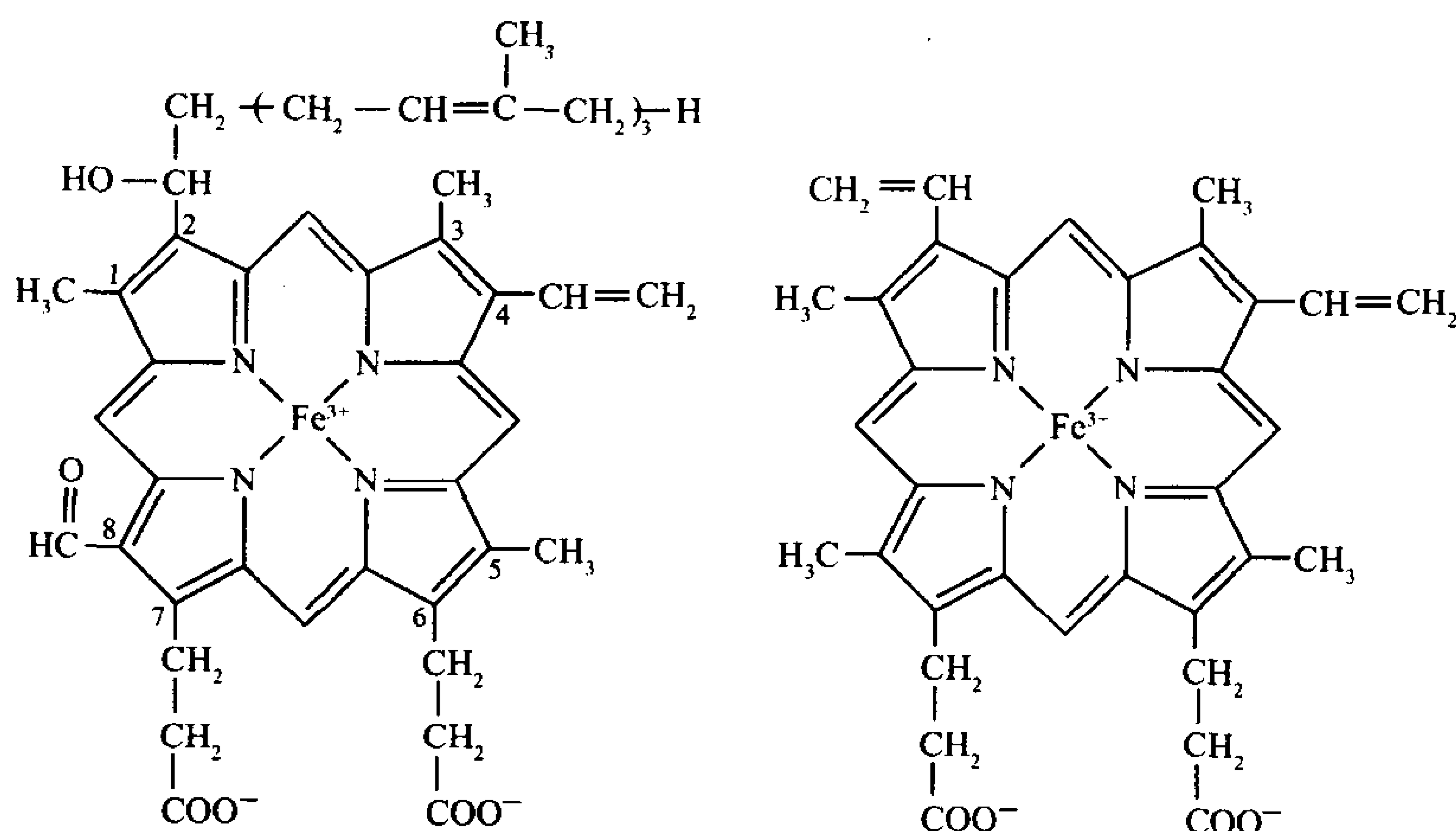
还原态 Fe(II)细胞色素的血红素基团显示由 3 个峰 α、β 和 γ(Soret)带组成的显著的可见光吸收光谱。细胞色素 *c* 吸收光谱如下。α 峰的波长随还原态细胞色素的种类(在被氧化的细胞色素中它不存在)改变,它常被用来鉴别不同的细胞色素(下图)。



每组细胞色素含有与具氧化还原活性的铁原子相匹配的有不同替代基的血红素基团。*b* 型细胞色素含有在肌红蛋白和血红蛋白也存在的原卟啉 IX(节 7-1A),*c* 型细胞色素的血红素基团与原卟啉 IX 不同,它的乙烯基双键打开通过半胱氨酸的巯基与蛋白形成巯醚键。血红素 *a* 含有一条长的与卟啉相连的由异戊二烯单位组成的疏水尾巴,另外血红素 *b* 和 *c* 的一个甲基代之以醛基。血红素铁原子的轴向配基也因细胞色素类型而改变。在细胞色素 *a* 和 *b*,其配基都是组氨酸残基,而细胞色素 *c* 的配基一个是组氨酸,另一个是蛋氨酸的硫原子。

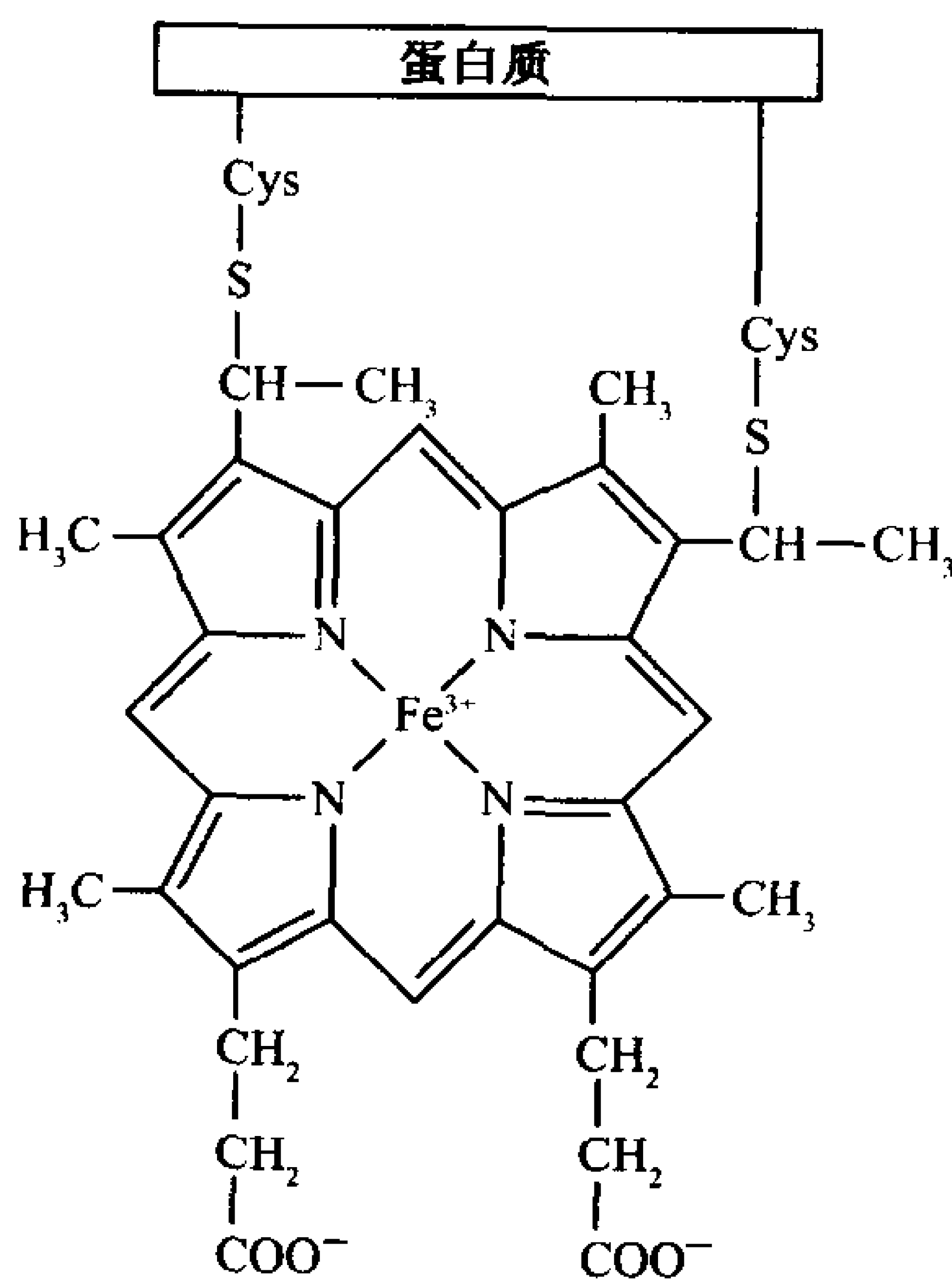
在每一组细胞色素内,不同血红素基的环境的差别可以由略有不同的 α 峰标示出来。据此,由 α 峰最大吸收的波长(nm)可以方便地鉴别不同的细胞色素(如复合物 II 中的细胞色素 b_{560})。细胞色素也用数字或字母予以分类,不用过多地描述。

还原性血红素是高反应性基团，它们能以有重要生理学意义的速率转移电子跨越 10～20 Å 的距离。因此在这个意义上，细胞色素具有与酶相对立的功能：不同于遭遇反应而无反应性的底物，它们必须防止它们的血红素将电子非特异地转移到其他细胞成分。毫无疑问地，这就是为什么这些血红素几乎整个被蛋白所包裹起来。然而，细胞色素同样必须为电子转移到适合的反应物提供途径。既然电子通过化学键比通过空间进行转移更为有效率，蛋白的结构就成为蛋白之间电子转移速率的重要决定因素。



血红素*a*

血红素*b*
(铁-原卟啉IX)



血红素*c*

电子从琥珀酸传递给 CoQ 释放的由自能（图 17-7）不足以驱动 ATP 合成。但是这个复合体仍然很重要，因为它使得相对高电势的电子绕过复合体 I 进入电子传递链。

请注意，尽管称之为复合体 I 和 II，但它们并非连续作用。两者都产生相同的结果：将电子由还原态底物（NADH 或琥珀酸）传递给 CoQ。在呼吸复合体的脂双层中扩散的 CoQ，成为电子的接收位点。我们将在节 19-2C 看到，脂肪酸氧化的第一步反应产生的电子就是在 CoQ 水平进

入电子传递链的。CoQ 还从 $FADH_2$ 获得由磷酸甘油穿梭产生的电子(图 17-4)。

E. 复合体 III(辅酶 Q-细胞色素 *c* 氧化还原酶)

复合体 III(亦称**细胞色素 bc_1**)将电子由还原态的 CoQ 传递给细胞色素 *c*。它含有 2 个 ***b* 型细胞色素**、1 个**细胞色素 c_1** 和 1 个[2Fe-2S]簇[称为**瑞斯克中心**(Rieske center)]。牛心脏线粒体中的复合体 III 是一个二聚体,每个单体分子质量为 248kDa,有 11 个亚基。由 Johann Deisenhofer 确定的 X 射线结构(图 17-12)为一梨形二聚体,其最宽部分伸入线粒体基质中,长达 75 Å。每个单体厚 42 Å 的跨膜部分由 13 个跨膜螺旋组成,这些螺旋多数相对于膜平面呈倾斜状。其中 8 个螺旋属于**细胞色素 *b*** 亚基,该亚基与两种 *b* 型细胞色素血红素 b_{562}(或 b_H,具有高电势,位于膜间隙附近)和 b_{566}(或 b_L,具有低电势,位于基质附近)都结合。与瑞斯克中心结合的**铁-硫蛋白**(ISP)通过其 N 端 2 个螺旋锚定于跨膜区域,并伸入瑞斯克中心所处的膜间隙。**细胞色素 c_1** 亚基也通过其 C 端螺旋类似地锚定于跨膜区域,并将一个球状的、可相对移动的含一个 *c* 类血红素的结构域伸入膜间隙 38 Å。复合体埋入线粒体基质的部分主要含 2 个结构相似的亚基,称为核心 1 和核心 2。

506

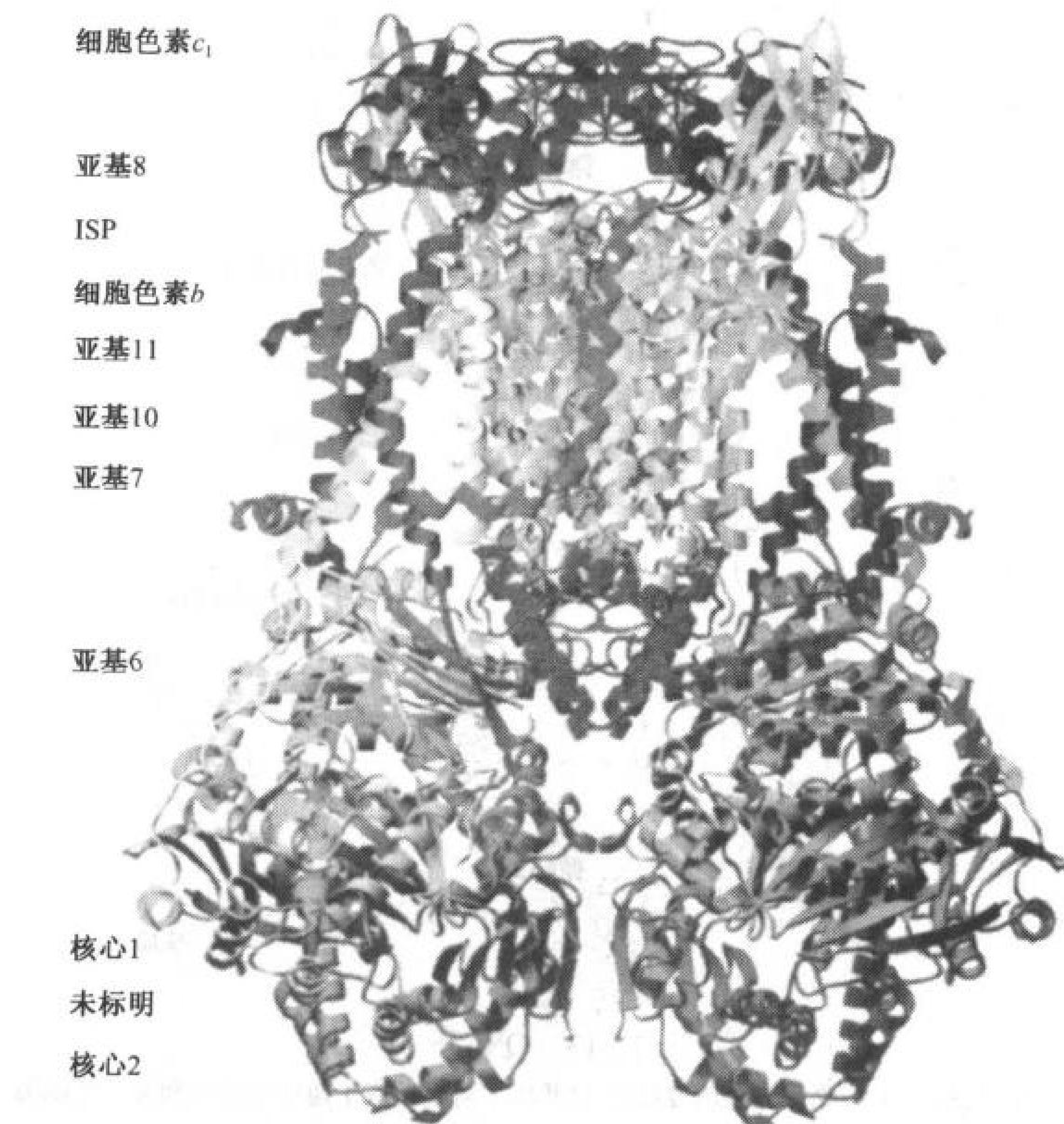


图 17-12　细胞色素 bc_1(复合物 III)的 X 射线结构图

来自牛心脏的该二聚体蛋白的视图包括该二聚体位于线粒体内膜的部分和位于该图顶部的膜间隙部分。染色的条带表示各亚基的多肽链,棒条表示血红素。该复合物的顶部伸入膜间隙,中部区域跨线粒体内膜部分主要由平行的 α 螺旋构成,下部区域延伸入基质。(引自 Johann Deisenhofer, University of Texas Southwestern Medical Center)

复合体III 中的电子传递:Q 循环

复合体 III 的功能是使 1 分子 $CoQH_2$(双电子传递体)还原 2 分子细胞色素 c(单电子传递体)。它是通过两个意想不到的电子流分支，即电子从 $CoQH_2$ 分别流向胞色素 c_1 和细胞色素 b 的电子流(后一个电子流也是循环)完成的。这就是所谓的 **Q 循环**(Q cycle),使复合体 III 将质子由基质泵到膜间隙。

Q 循环的实质是 $CoQH_2$ 通过双循环进行再氧化，其中半醌 $CoQ^{\overline{\cdot}}$是稳定的中间体。该过程

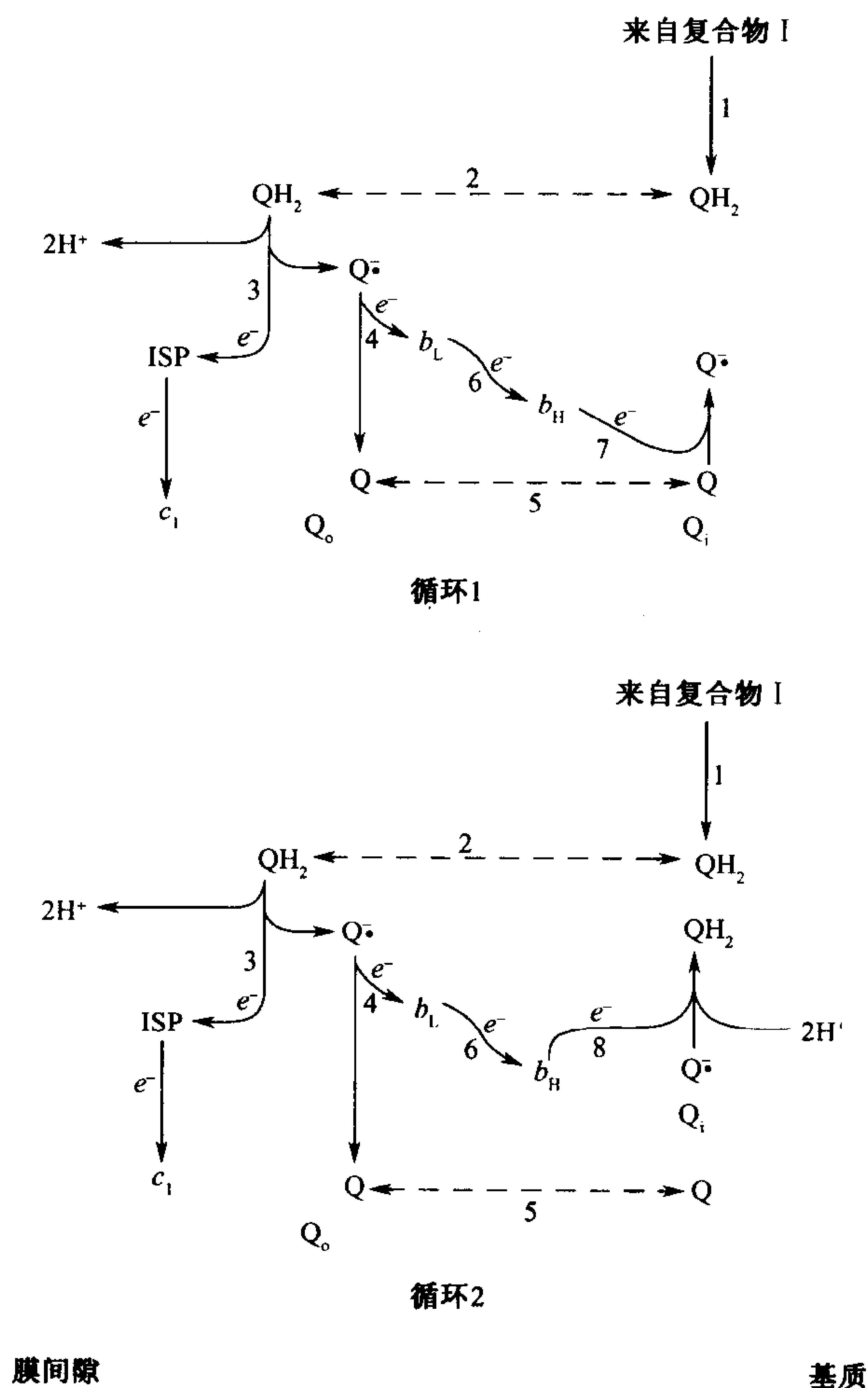


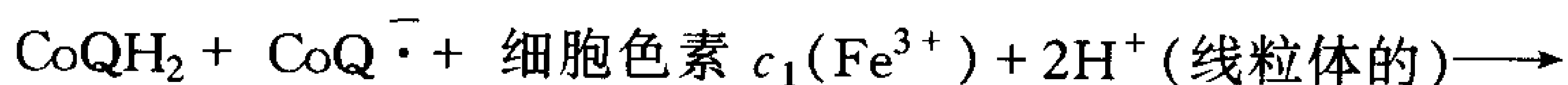
图 17-13 Q 循环

Q 循环实际是两个循环，循环 1 需要反应 1 通过反应 7，循环 2 需要反应 1 通过反应 6 和 8。(1)辅酶 QH_2 由位于膜基质侧的复合物 I 提供。(2)QH_2 扩散到膜的胞浆侧，与复合物 III 的细胞色素 b 亚基上的 Q_O 位点结合。(3)QH_2 还原 Rieske 铁硫蛋白(ISP)形成 $CoQ^{\overline{\cdot}}$半醌并释放 $2H^+$。ISP 再还原细胞色素 c_1。(4) $CoQ^{\overline{\cdot}}$还原细胞色素 b_1 形成辅酶 Q。(5)循环 1 中的 Q 和循环 2 中的 $Q^{\overline{\cdot}}$扩散到基质一侧结合于细胞色素 b 的 Q_i 位点。(6)细胞色素 b_L 还原 b_H。(7,仅对循环 1)Q 被 b_H 还原成 $CoQ^{\overline{\cdot}}$。(8,仅对循环 2)结合于 Q_i 位点的 $CoQ^{\overline{\cdot}}$被细胞色素 b_H 还原成 $CoQH_2$。总反应是两个电子从 $CoQH_2$ 转运到细胞色素 c_1 而 4 个质子从基质转运到膜间隙。[引自 Trumpower, B. L., J. Biol. Chem. 265, 11410(1990)]

涉及到辅酶 Q 的 2 个独立的结合位点 Q_o 和 Q_i。Q_o 与 $CoQH_2$ 结合，位于瑞斯克[2Fe-2S]中心和血红素 b_L 之间靠近膜间隙处。Q_i 与 $CoQ^{\overline{\cdot}}$ 和 CoQ 结合，位于血红素 b_H 附近靠近基质处。在第一个循环中(图 17-13a)，来自复合体 I 的 $CoQH_2$(1 和 2)结合于 Q_o 位点，在这里将它的一个电子传递给 ISP(3)，并释放 2 个质子进入膜间隙，产生 $CoQ^{\overline{\cdot}}$。ISP 继续还原细胞色素 c_1，而 $CoQ^{\overline{\cdot}}$ 将其余的电子传递给细胞色素 b_L(4)，产生完全氧化的 CoQ。然后细胞色素 b_L 还原细胞色素 b_H(6)。第 4 步得到的 CoQ 从 Q_o 位点释放出来并与 Q_i 位点(5)重新结合，并接收来自细胞色素 b_H 的电子(7)，恢复为半醌形式 $Q^{\overline{\cdot}}$。这样，第一个循环的反应式为：


$$CoQH_2 + \text{细胞色素 } c_1(Fe^{3+}) \longrightarrow CoQ^{\overline{\cdot}} + \text{细胞色素 } c_1(Fe^{2+}) + 2H^+(\text{胞质的})$$

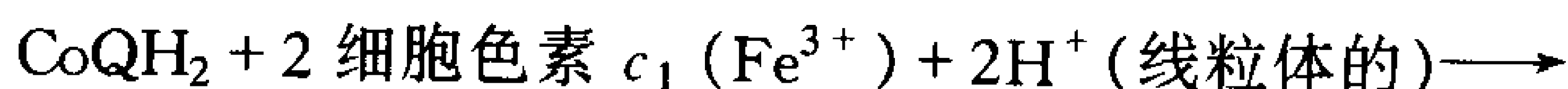
在第二个循环中(图 17-13b)，另一个来自复合体 I 的 $CoQH_2$ 重复 1 至 6 步反应：1 个电子先后还原 ISP 和细胞色素 c_1，另一个电子依次还原细胞色素 b_L 和细胞色素 b_H。然后第二个电子在 Q_i 位点还原由第一个循环(8)产生的 $CoQ^{\overline{\cdot}}$，得到 $CoQH_2$。这最后一步中消耗的质子来源于线粒体基质。第二个循环的反应式为：



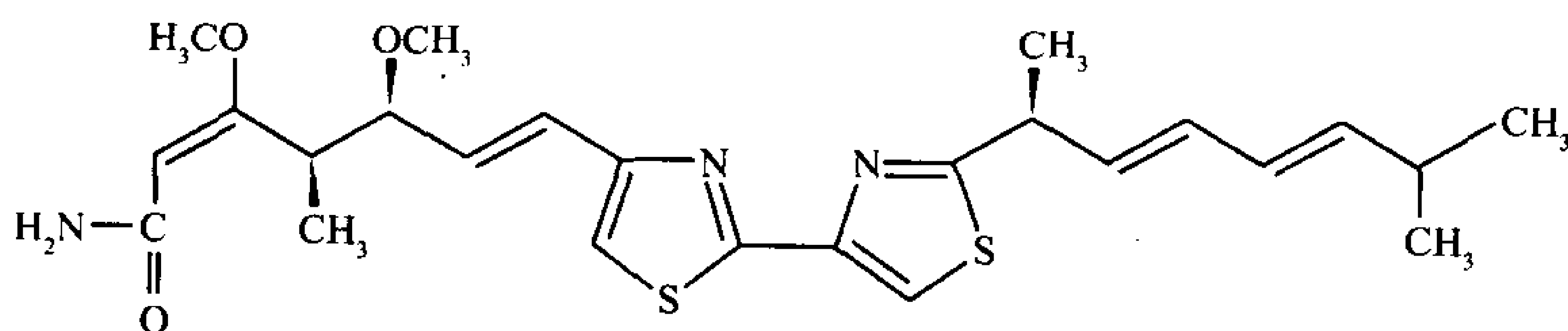
$$CoQH_2 + CoQ^{\overline{\cdot}} + \text{细胞色素 } c_1(Fe^{3+}) + 2H^+(\text{线粒体的}) \longrightarrow CoQ + CoQH_2 + \text{细胞色素 } c_1(Fe^{2+}) + 2H^+(\text{胞质的})$$

每 2 个 $CoQH_2$ 进入 Q 循环，就重新生成一个 $CoQH_2$。将 2 个循环结合起来，致使 2 个电子由 $CoQH_2$ 传递给细胞色素 c_1，总反应式为：

507



$$CoQH_2 + 2\,\text{细胞色素 } c_1(Fe^{3+}) + 2H^+(\text{线粒体的}) \longrightarrow CoQ + 2\,\text{细胞色素 } c_1(Fe^{2+}) + 4H^+(\text{胞质的})$$



黏噻唑

对复合体 III 的 X 射线研究为 Q_o 位点和 Q_i 位点的独立存在提供了直接证据。已知抗真菌剂**黏噻唑**(myxothiazol)可以阻断电子从 $CoQH_2$ 流向 ISP 和血红素 b_L(两个循环的第 3、4 步)，它结合于细胞色素 b 内一个口袋中，这个口袋位于瑞斯克[2Fe-2S]中心的铁位点和血红素 b_L 之间。这样，这个结合口袋很可能与 Q_o 位点重叠。与此类似，前已提到的抗霉素 A 能够阻断从血红素 b_H 到 CoQ 或 $CoQ^{\overline{\cdot}}$ 的电子流(循环 1 的第 7 步和循环 2 的第 8 步)，它结合于血红素 b_H 附近的一个口袋中，因而确认该口袋是 Q_1 位点。

508

复合体 III 中电子传递的迂回路线是基于辅酶 Q 能够在膜的疏水中心扩散而有利于与 Q_o 和 Q_i 位点结合。当 $CoQH_2$ 被氧化时，2 个还原型细胞色素 c 分子和 4 个质子出现在膜外侧。因此 Q 循环中的质子传递不同于复合体 I 和 IV 的质子泵机理(见下文)：在 Q 循环中，氧化还原中心(CoQ)本身就是质子载体。

细胞色素 c：一种可溶的电子载体

流向细胞色素 c_1 的电子传递给细胞色素 c。细胞色素 c 不同于呼吸链中的其他细胞色素，是一种外周膜蛋白。在线粒体内膜外表面，它在复合体 III 和 IV 之间穿梭传递电子。细胞色素 c 的结构和进化在节 5-4A 和节 6-2C 中已经讨论。细胞色素 c 中几个固有的赖氨酸残基环绕其

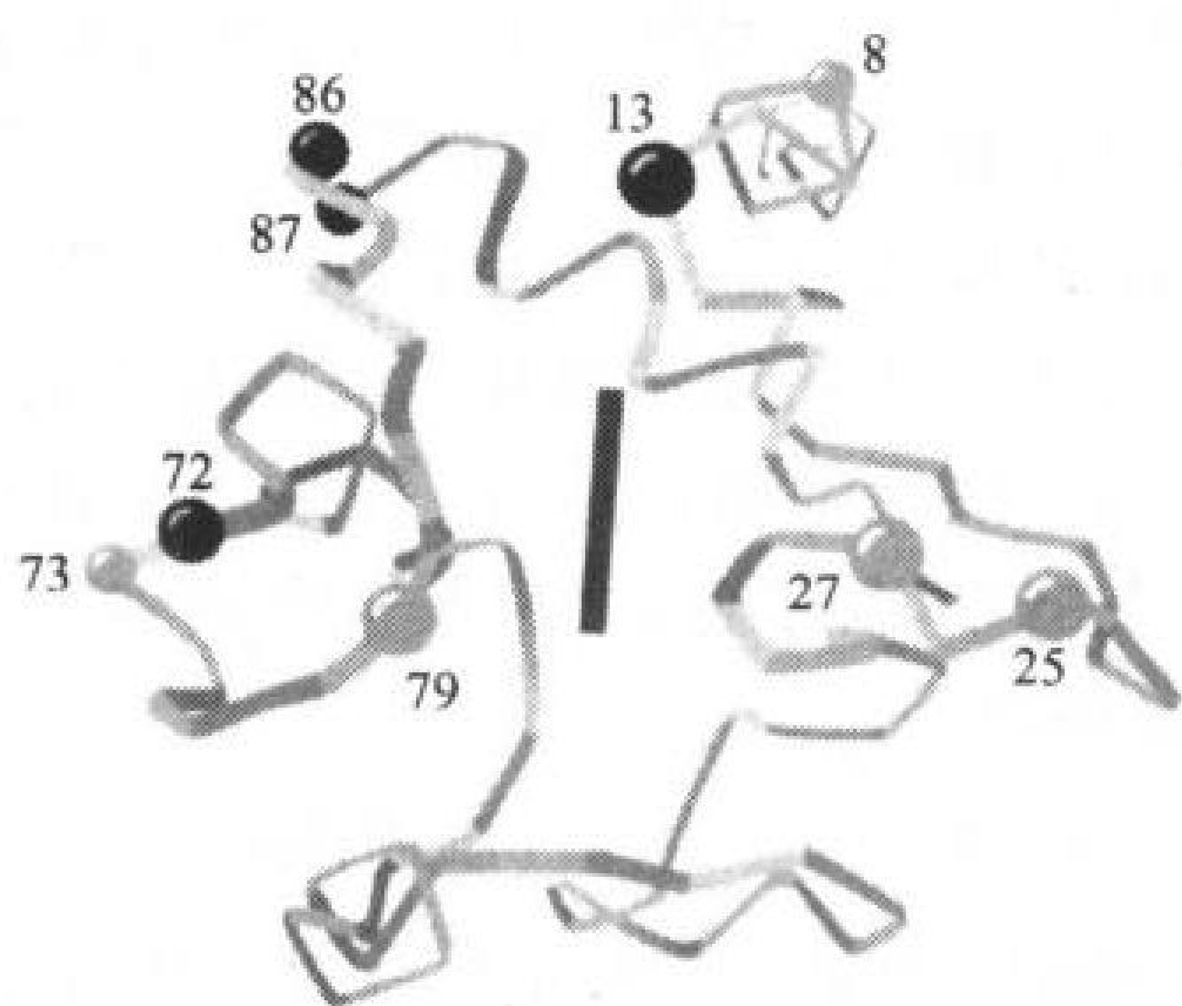


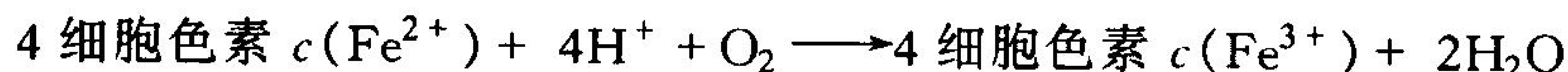
图 17-14 细胞色素 c 的条带图显示赖氨酸残基包裹于分子间复合物结构之中

深蓝色和浅蓝色球分别标记赖氨酸残基的位置，它们的 ε-氨基被细胞色素 c_1 或细胞色素 c 氧化酶紧密地或较松弛地保护以防乙酰化。请注意这些赖氨酸残基围绕位于蛋白表面的血红素(实心棒)形成一个环。[引自 Mathews, F.S., Prog. Biophys. Mol. Biol. 45, 45(1986)]

包埋着的血红素基团裸露的边缘形成一个圆环(图 17-14)。通过**差异标记**(differential labeling)实验证实这些残基构成一个结合位点：在有或无细胞色素 c_1 的情况下，用乙酸酐(能够乙酰化赖氨酸残基)处理细胞色素 c，表明细胞色素 c_1 可以完全屏蔽细胞色素 c 的这些赖氨酸残基。细胞色素 c 中其他远离血红素裸露边缘的赖氨酸残基的反应性不受细胞色素 c_1 的影响。用细胞色素 c 氧化酶代替细胞色素 c_1 得到几乎完全相同的结果。显而易见，这两种蛋白都有带负电荷的位点，与细胞色素 c 中带正电荷的赖氨酸残基圆环互补。这种离子配对作用可能使得氧化还原基团的排列最适于电子传递。

F. 复合体 IV(细胞色素 c 氧化酶)

细胞色素 c 氧化酶催化 4 个连续的还原态细胞色素 c 分子进行单电子氧化，同时伴随一个 O_2 分子的 4 电子还原：



$$4\ 细胞色素\ c(Fe^{2+}) + 4H^+ + O_2 \longrightarrow 4\ 细胞色素\ c(Fe^{3+}) + 2H_2O$$

哺乳动物的复合体 IV 是二聚体，其单体相对分子质量约为 200kDa，由 13 个亚基组成。Shinya Yoshikawa 测定了牛心脏线粒体的复合体 IV 的 X 射线结构，显示其中 12 个亚基是跨膜蛋白，共含 28 个跨膜 α 螺旋(图 17-15)。复合体 IV 的核心由 3 个最大也是最为疏水的亚基 I、II 和 III 组成，它们由线粒体 DNA 编码(其余亚基由细胞核编码并且必须运入线粒体)。该蛋白质朝向膜间隙的表面上有一个凹面，含有大量酸性氨基酸，它们有可能与细胞色素 c(复合体 IV 的电子供体)中的赖氨酸残基圆环相互作用。

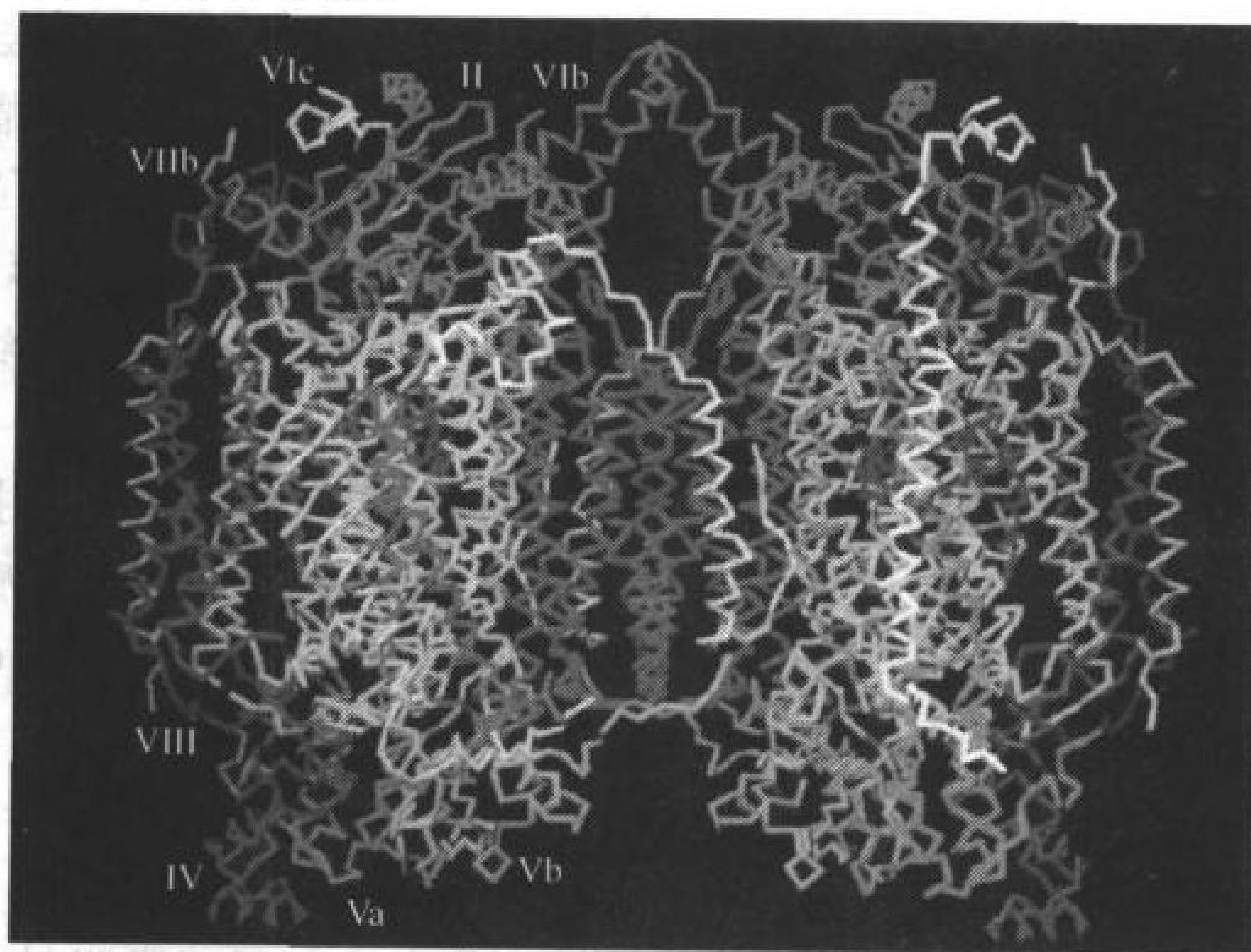


图 17-15 牛心脏细胞色素 c 氧化酶二聚体的 X 射线结构图

13 个亚基各以不同的颜色显示，勾画出 C_α 连接的轮廓图。视图包括膜内部分和顶部的膜间隙部分。(引自 Shinya Yoshikawa, Osaka University, Japan)

509

复合体 IV 含有 4 个氧化还原中心：**细胞色素 *a*、细胞色素 a_3、称为 Cu_B 的一个铜原子和称为 Cu_A 中心**的一对铜原子。此外，还有一个 Mg^{2+} 和一个 Zn^{2+}（图 17-16）。与亚基 II 结合的 Cu_A 中心位于膜表面上方 8 Å 处。它的 2 个铜离子被 Cys 残基的 2 个硫原子桥接，使其具有类似[2Fe-2S]簇的几何形状。其他氧化还原基团 Cu_B、细胞色素 *a* 和细胞色素 a_3 都与亚基 I 结合，并且位于膜表面下方约 13 Å 处。Mg^{2+} 可能参与电子传递或者稳定氧化还原中心的排列；而 Zn^{2+} 是锌指序列（节 6-4A）的一部分，并且远离氧化还原中心，几乎肯定是起结构上的作用而非催化作用。

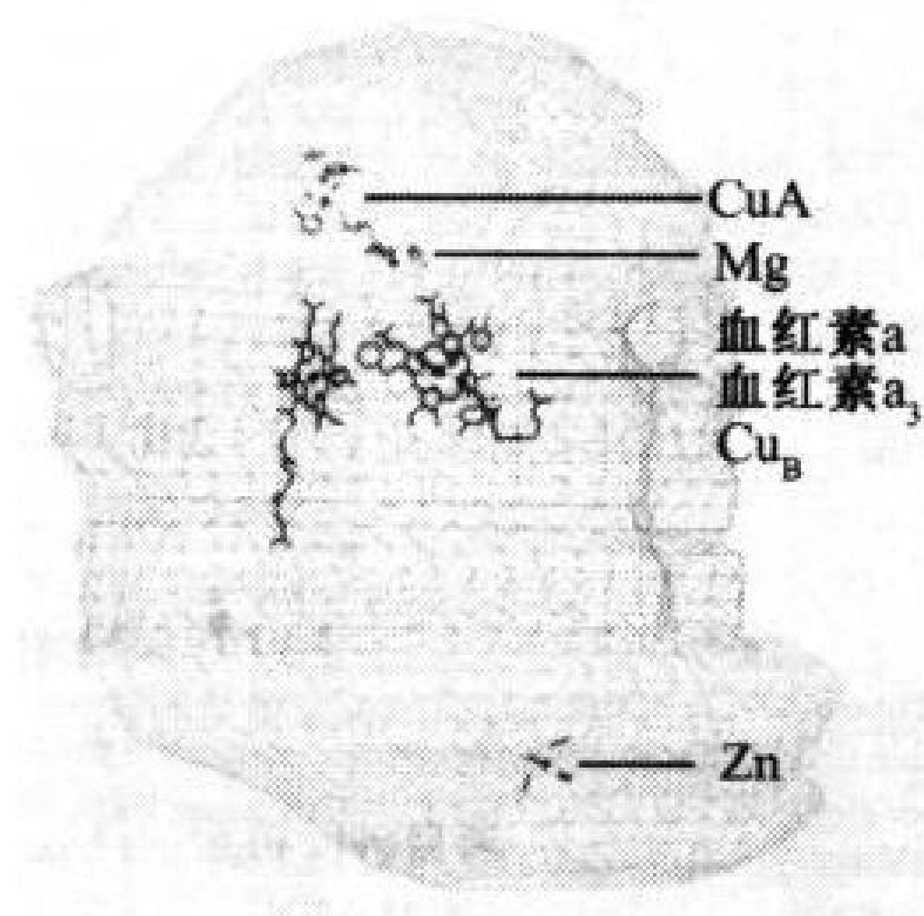


图 17-16 牛心脏细胞色素 *c* 氧化酶的氧化还原中心的定位图

蛋白质表面以骨架结构显示，黄色表示跨膜部分，青蓝色表示伸进膜间隙（顶部）的部分。红色表示血红素 *a*（左）和血红素 a_3（右），Cu 离子为绿色，Mg^{2+} 为橘红色，与 Mg^{2+} 配位的水分子氧为蓝色，与金属离子配位的氨基酸侧链用绿色和灰色表示。在结构底部的 Zn^{2+} 不参加氧化还原反应。（引自 Shinya Yoshikawa, Osaka University, Japan）

510

分光镜研究表明复合体 IV 中的电子传递是线性的，传递顺序是从细胞色素 *c* 到 Cu_A 中心，然后到血红素 *a*，最后到血红素 a_3 和 Cu_B。血红素 a_3 的 Fe 距 Cu_B 只有 4.5 Å，这些氧化还原基团可能由 1 个水分子桥接，而形成一个独立的双核复合体。电子似乎是通过一个氢键网络在复合体 IV 的氧化还原中心之间移动，该网络涉及氨基酸侧链、肽链骨架和血红素基团的丙酸盐侧链。

O_2 被细胞色素 *c* 氧化酶还原

O_2 被细胞色素 *c* 氧化酶还原为 $2H_2O$ 的反应发生在 a_3-Cu_B 双核复合体中。室温下该反应约在 1ms 内完成，它包括从 Cu_A 和细胞色素 *a* 位点的 4 个连续的单电子传递，其过程如下（图 17-17）：

1）和 2）2 个单电子从细胞色素 *c* 沿经细胞色素 *a* 和 Cu_A 中心传递，将双核的 Fe(III)a_3-Cu(II)$_B$ 复合体还原成 Fe(II)a_3-Cu(I)$_B$。

3）O_2 与还原态的双核复合体结合，并与复合体的 Fe(II) 和 Cu(I) 原子桥接。

4）内部电子重排，迅速产生稳定的过氧加合物 Fe(III)—O^-—O^- Cu(II)。

5）再传入一个电子，同时获取 1 个质子，加合物转变为 Fe(III)—O^-—OH Cu(I)。

511

6）获取第 2 个质子同时进行电子重排，生成 Fe(IV)—O^{2-} H_2O—Cu(II)[此时称 Fe (IV)为**弗里尔**(ferryl)氧化态]。

7）接受传入的第 4 个单电子，同时 1 个质子重排产生 Fe(III)—OH^- $^-$HO—Cu(II)。

8）最后，再获取 2 个质子，生成 $2H_2O$ 和 Fe(III)a_3—Cu(II)$_B$ 复合体，由此完成循环。

O_2 被细胞色素 *c* 氧化酶还原时消耗 4 个质子。这些质子来源于线粒体基质，可能是通过一种氢键网络到达血红素 a_3-Cu_B 复合体，该网络包括蛋白质上的基团和占据蛋白质结构空穴的水分子。反应产物水分子沿亲水通道离开酶，该通道在亚基 I、II 之间从血红素 a_3 延伸至酶的细胞一侧的表面。O_2 到达氧气还原位点的路线在完全氧化的酶的 X 射线结构中并不明显。复合体 Fe(III)a_3-Cu(II)$_B$ 还原时构象的变化也许打开了一种 O_2 通道，可能由疏水基团排列而成，并含有与蛋白质紧密结合的膜脂。

除了 4 个用于还原 O_2 的质子外，还有 4 个质子由基质转运到膜间隙（因此每 2 个电子通过

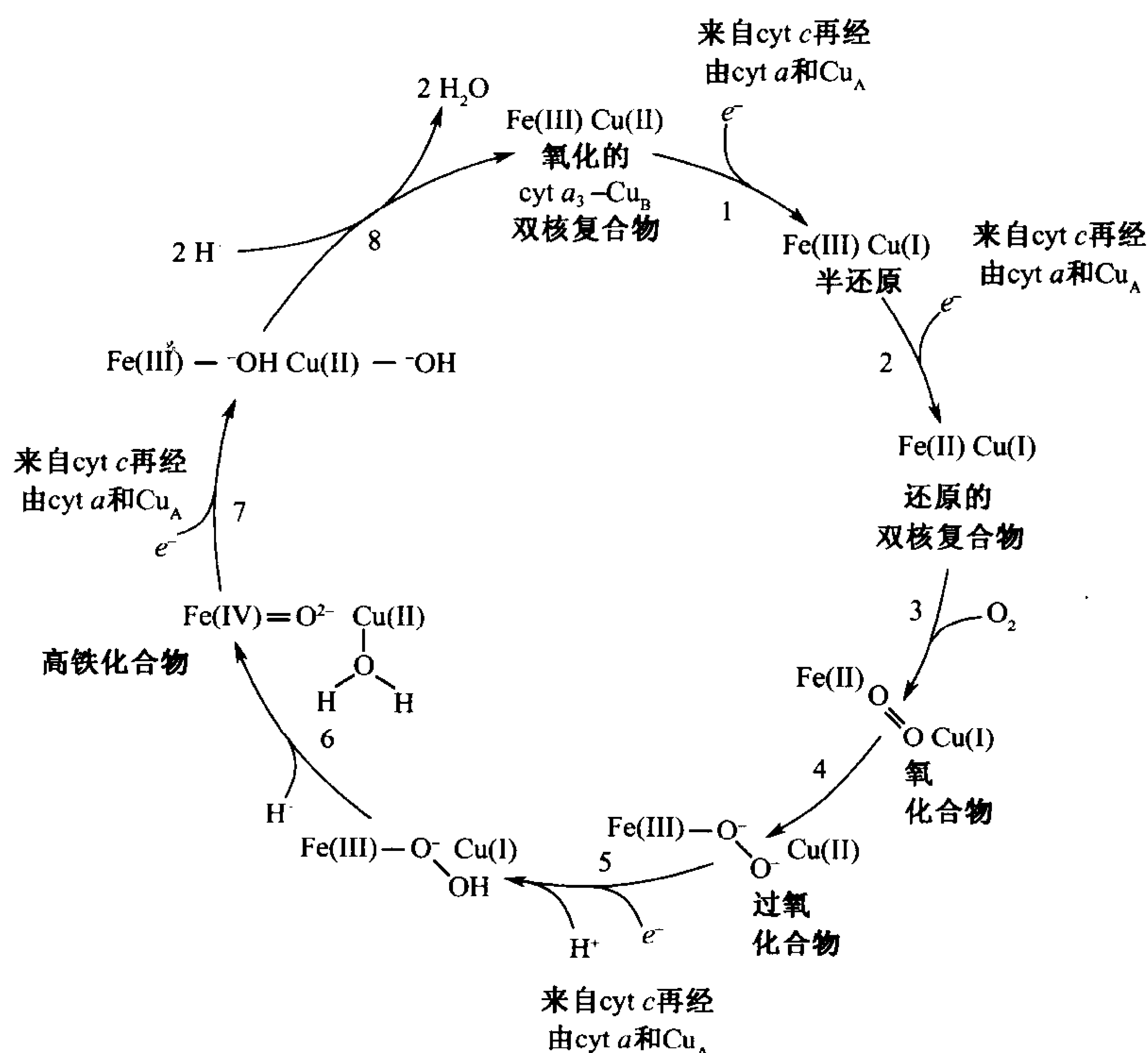


图 17-17 细胞色素 c 氧化酶反应

在细胞色素 a_3-Cu_B 双核复合物上将 O_2 还原成 H_2O 总共需要细胞色素 c 提供 4 个电子，同时伴随需要 4 个质子。

[引自 Vartosis, C., Zhang, Y., Appelman, E.H., and Babcock, G.T., Proc. Natl. Acad. Sci. 90, 240(1993)]

复合体 IV，就要转运 2 个质子；图 17-8）。上述复合体 IV 中质子传递途径涉及氨基酸侧链和蛋白质中水分子形成的氢键网络。值得注意的是复合体 IV 中的质子泵更类似于复合体 I 而非复合体 III，后者中 CoQ 在氧化时运送质子。

3. 氧化磷酸化

线粒体中从 ADP 和 P_i 合成 ATP 的耗能反应由 **ATP 合酶**(ATP synthase，亦称**复合体 V**)催化，反应被电子传递过程驱动。电子从复合体 I 传递至复合体 IV 所释放的自由能必须以一种 ATP 合酶能够利用的形式储存。这种能量储存称为**能量偶联**(energy coupling)。

能量偶联的物理特性十分令人困惑，许多合情理并通常很巧妙的想法都未能被严格的实验研究证实。例如，一个现已遗弃的理论认为电子传递产生一种“高能的”中间体，随后它分解并驱动 ATP 合成。但这样的中间体从来没有证实。事实上，ATP 合成是通过电子在复合体 I、III 和 IV 中传递时产生的跨膜质子梯度与电子传递相偶联。在这一节中，我们将阐述这种偶联的机理和 ATP 合成过程。

A. 化学渗透学说

由 Peter Mitchell 于 1961 提出的**化学渗透学说**(chemiosmotic theory)在被广泛接受以前曾

引起过相当大的争议。Mitchell 的学说认为电子传递释放的自由能通过将质子从线粒体基质泵到膜间隙形成一个跨线粒体内膜的电化学 H^+ 梯度而得以储存。这一梯度的电化学势用于合成 ATP(图 17-18)。若干重要现象可由化学渗透学说解释： 512

1) 氧化磷酸化要求完整的线粒体内膜。
2) 线粒体内膜对 H^+、OH^-、K^+ 和 Cl^- 等离子不通透，它们的自由扩散将会消减电化学梯度。
3) 电子传递导致 H^+ 被运出完整线粒体(膜间隙相当于细胞质)，因而产生一个可测量的跨线粒体内膜的电化学梯度。
4) 某些因能增加线粒体内膜对质子的通透性而消减电化学梯度的化合物，能使电子传递(来自 NADH 和琥珀酸氧化)继续进行，但是却抑制 ATP 合成；也就是说它们使电子传递与氧化磷酸化"解偶联"。相反地，增加线粒体内膜外侧的酸性将刺激 ATP 合成。

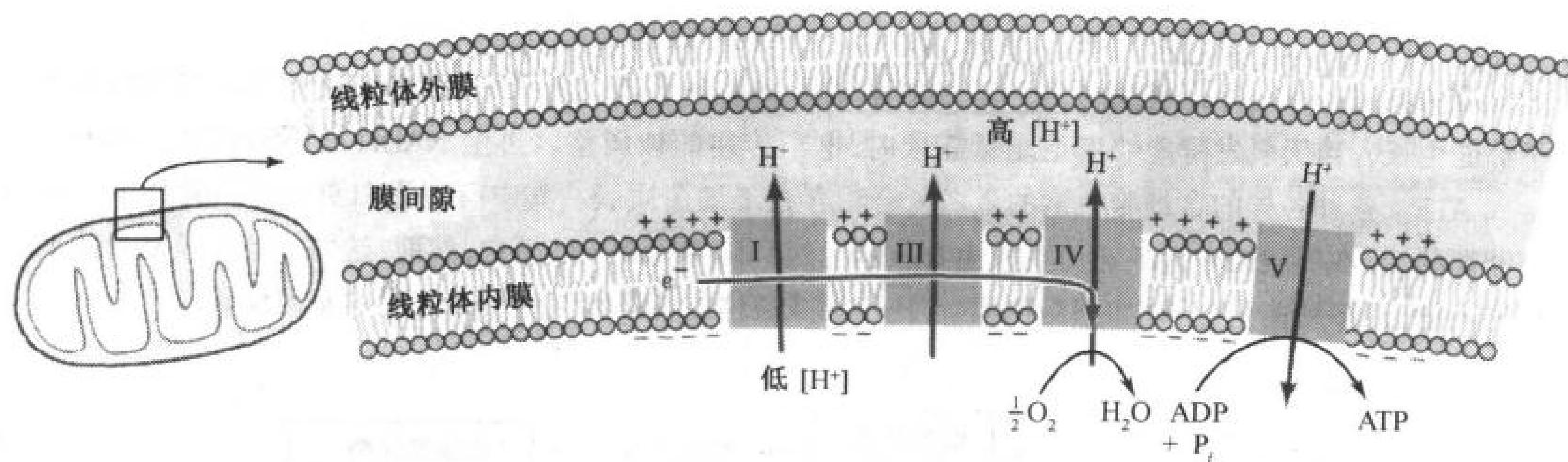


图 17-18　电子传递与 ATP 合成相偶联

电子传递(绿色箭头)产生跨线粒体内膜的质子电化学梯度。电子传递过程中，H^+ 被泵出线粒体(蓝色箭头)，产生的还原力合成 ATP(红色箭头)。应注意膜间隙是完全与胞浆平衡的，因为线粒体的外膜允许 H^+ 透过。

细菌中也存在一个完全相似的过程，它们的电子传递体系位于其原生质膜上(框 17-2)。

电子传递产生质子梯度

正如我们知道的，电子传递使得复合体 I、III 和 IV 将质子从低[H^+]区域的基质跨过线粒体内膜转运到高[H^+]区域的膜间隙(它与胞质相通)(图 17-8)。自由能被产生的电化学梯度[亦称**质子驱动力**(protonmotive force, pmf)]储存，驱动 ATP 合成。

因为 H^+ 是离子，所以将质子转运出线粒体产生的自由能变化包括化学能及电能两部分。因而 ΔG 可用公式 10-3 表示(公式根据 pH 值计算)：

$$\Delta G = 2.3RT[\text{pH}(\text{内}) - \text{pH}(\text{外})] + ZF\Delta\psi \qquad [17-1]$$

其中 Z 是质子电荷(包含符号)，F 是法拉第常数，$\Delta\psi$ 是膜电位。$\Delta\psi$ 的符号约定为：当质子由负极转运到正极时，$\Delta\psi$ 为正。因为 pH(内)小于 pH(外)，所以将质子由线粒体基质运出(逆质子梯度)是吸能过程。 513

例如，肝线粒体的跨内膜电位的测量值为 0.168V(内侧为负)。其基质的 pH 比膜间隙的高 0.75 个单位。因此将质子转运出线粒体基质的 ΔG 为 $21.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$。因为质子梯度的形成是吸能过程，所以该梯度的消减是放能过程。释放的自由能用于 ATP 合酶驱动 ADP 磷酸化。

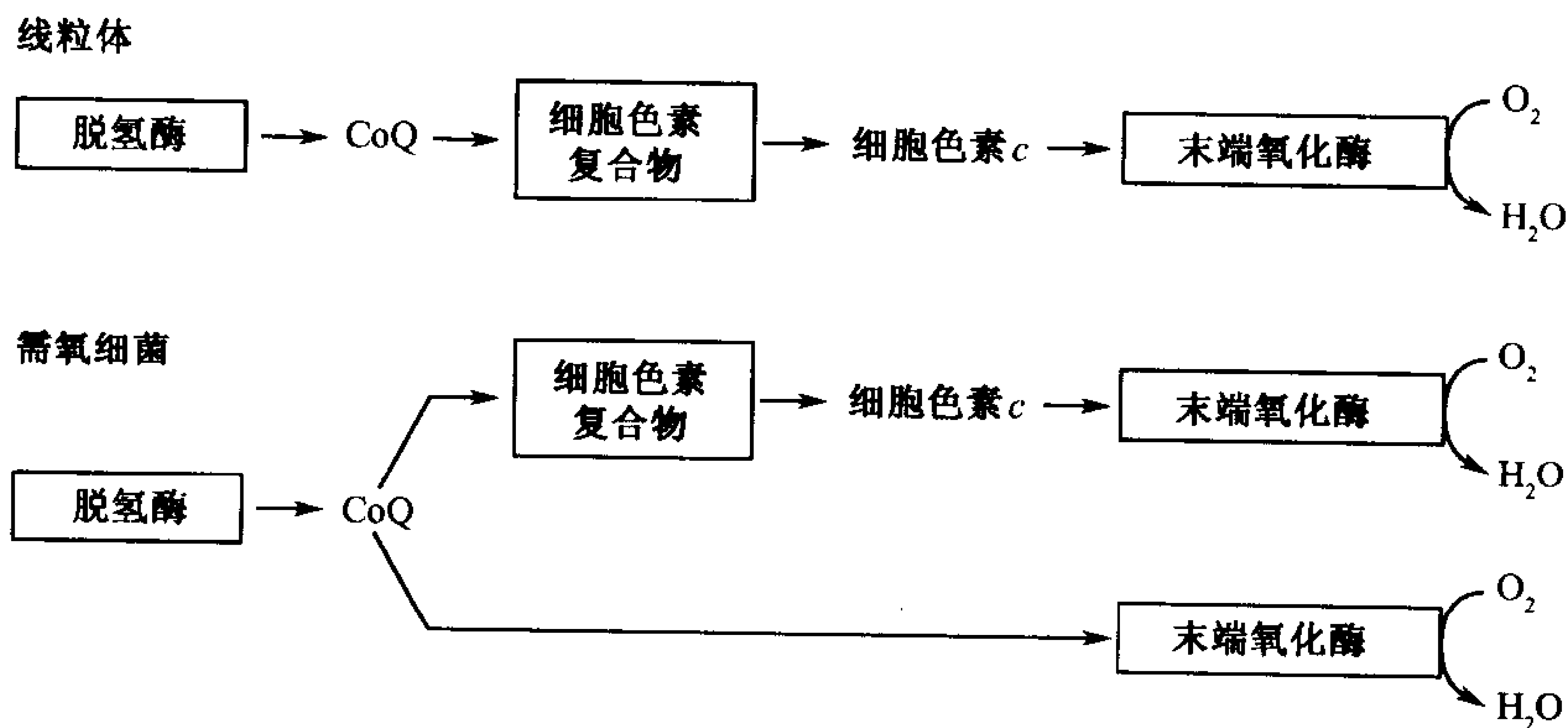
框 17-2 生物化学相关内容

细菌的电子传递和氧化磷酸化

其远古的祖先演化为线粒体的需氧细菌采用相似的机制氧化还原态辅酶并以 ATP 合成储藏其能量，人们对此已不感到惊讶。在细菌中呼吸电子传递链的成分定位于质膜，质子从胞浆泵出到质膜外。质子借助催化部位面向胞浆的 ATP 合成酶流返胞浆。这样准确相似的安排，符合细菌和线粒体在演化上相关联的假说。

$CoQH_2$的氧化普遍存在于需氧生物，在线粒体 CoQ 捕获由 NADH(经复合物 I)、琥珀酸(经复合物 II)和脂肪酸提供的电子。在细菌由针对众多底物的脱氢酶提取的电子为 CoQ 所捕获。如同在线粒体，在细菌中，电子从 CoQ 流经基于细胞色素的氧化还原酶最终达到氧分子。

多复合物电子传递途径的优点是为质子跨质膜转位提供更多的机会，这样每个电子产生的 ATP 更多。然而在有能使存在于细菌中的线粒体复合物 III 类似物失活的毒素存在的情况下，较短的电子传递途径表现出一种可供选择的方便。多途径的电子传递也可能使细菌通过调整氧化磷酸化得以利用不同的能源和针对各种还原态辅酶再生平衡 ATP 合成。例如对于兼性厌氧细菌(它们在有氧或缺氧的情况下都能生长)，当厌氧发酵能够满足能量需求时，电子传递能被调整以再生 NADH 而不通过氧化磷酸化合成 ATP。各种各样的含细胞色素的蛋白复合物存在于细菌质膜。其中有些蛋白更像与线粒体复合物有渊源的“版本”，虽然它们缺乏由真核生物核基因组编码的另外一些蛋白，然而，这并非是呼吸复合物的普遍特征，许多细菌蛋白质(如细胞色素 *d*)找不到线粒体或核基因组中与之匹配的基因编码。



据估计合成 1 分子 ATP 所需的生理自由能大约为 +40～+50kJ·mol^{-1}，这大大超过将一个质子运回线粒体基质所释放的能量，因此驱动 ATP 合成至少需要 2 个质子。事实上，大多数实验测量(很难精确定量)表明每合成 1 分子 ATP 大约需要 3 个质子。

514

B. ATP 合酶

ATP 合酶亦称为**质子泵 ATP 合酶**和 **F_1F_0-ATP 酶**，是一种多亚基跨膜蛋白，总相对分子质量为 450kDa。Efraim Racker 发现线粒体 ATP 合酶由 2 个功能单位 $\mathbf{F_0}$ 和 $\mathbf{F_1}$ 组成。F_0 是一种疏水跨膜质子通道，至少含有 8 种不同的亚基。F_1 是一种水溶性外周膜蛋白，由 5 种亚基组成，用尿素处理时，它很容易与 F_0 发生可逆的解离。可溶性的 F_1 可以水解但不能合成 ATP(因此称为 ATP 酶)。

在电子显微照片中，线粒体内膜的基质表面布满 ATP 合酶分子(图 17-19a)。F_1 成分通过

一个蛋白质柄与嵌入膜内的 F_0 成分相连，使得 F_1 亚基呈现棒棒糖样的形状（图 17-19b，c）。

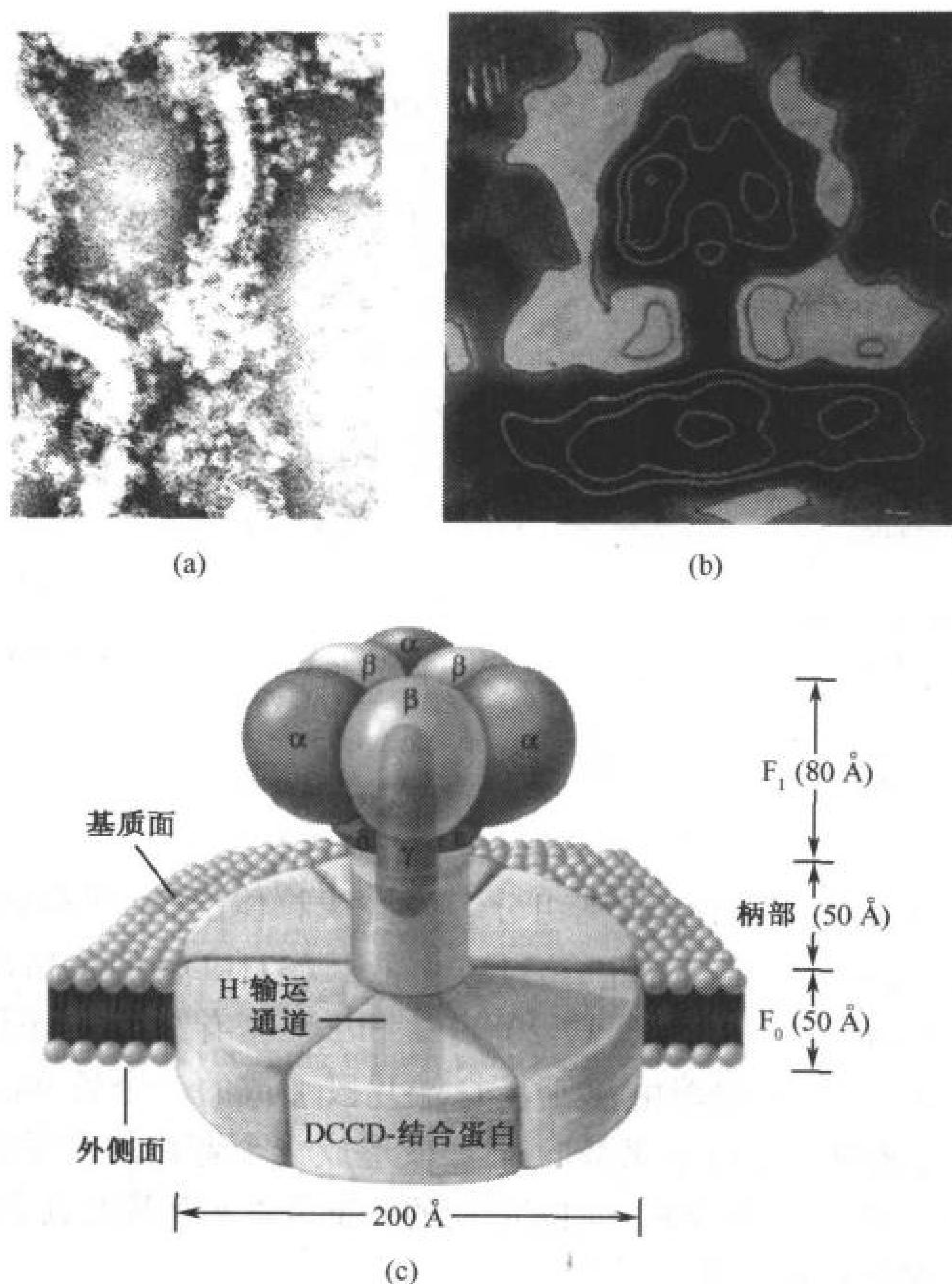


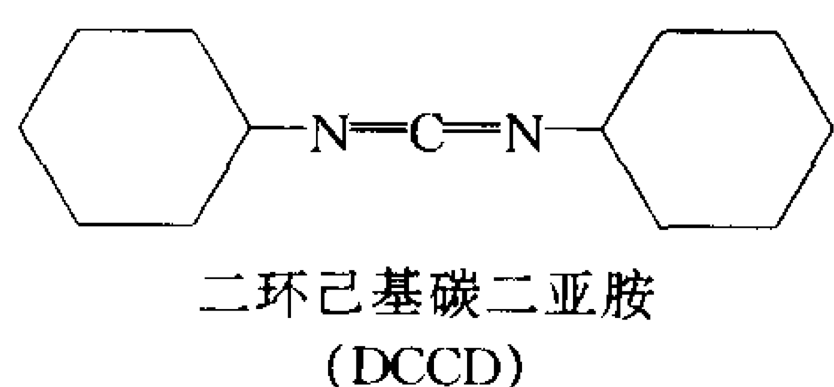
图 17-19 ATP 合酶的结构

(a)线粒体嵴的电镜图表明 F_1"棒糖"插进基质。[引自 Parson, D. F., Science 140, 985(1963). ©1963 American Association for the Advancement of Science] (b)大肠杆菌 F_1F_0-ATP 酶的冰冻蚀刻电镜图。类似盘状的 F_0 组分位于底部，更似球型的 F_1 组分位于顶部。大肠杆菌 ATP 合酶与真核生物的类似物相似但含有较少亚基。(引自 Edward Gogol and Roderick Capaldi, University of Oregon)(c)表明线粒体的 F_1F_0-ATP 酶中各亚基组分位置的示意图。

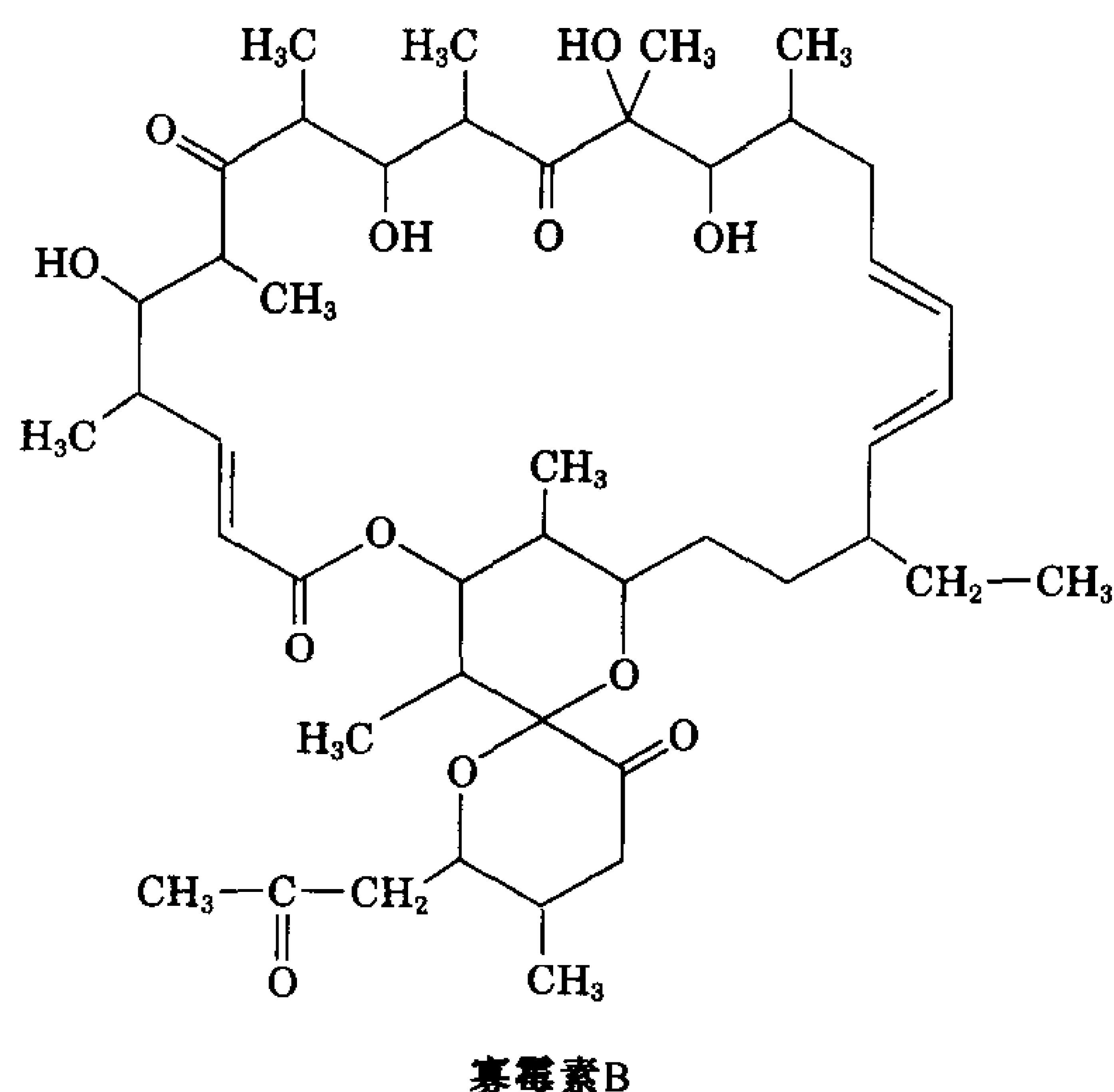
F_0 成分

F_0 成分的结构知道得并不详细。**二环己基碳二亚胺**(DCCD)是一种脂溶性羧基试剂，通过与 F_0 的一个亚基上的一个 Glu 残基反应抑制哺乳动物 F_0 中的质子传递。与 DCCD 的反应通常意味着一个羧酸基团位于脂环境中，也就是说它包埋在膜中。哺乳动物的 F_0 含 6 个相同的 **DCCD 结合蛋白**(DCCD-binding protein)，它们像一个桶的桶板一样相互联合，形成一个包埋有 Glu 残基的极性 H^+ 转运通道。抗生素**寡霉素 B**(oligomycin B)也能与 F_0 的亚基结合，抑制 H^+ 转运。由于抑制了从膜间隙流回基质的质子流(顺浓度梯度)而阻断 ATP 合成。

515



二环己基碳二亚胺
(DCCD)



寡霉素B

F_1 成分

ATP 合酶的 F_1 成分具有 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ 亚基组分。牛心线粒体的 F_1 亚基的 X 射线结构已经由 John Walker 和 Andrew Leslie 测定。这个含 3440 个残基(371kDa)的蛋白质组装在一个长 30Å 的柄上,呈扁圆体状,高 90Å,宽 100Å(图 17-20a)。α 和 β 亚基有 20% 的序列相同并具有几乎相同的折叠,它们像橘子瓣一样,围绕着由 γ 亚基 C 端片段形成的一个长 90Å 的 α 螺旋的顶部交替排列(图 17-20b)。螺旋的下部与 γ 亚基 N 端片段形成一个弯曲的左手反平行盘绕螺旋。几乎可以肯定,这个盘绕的螺旋是连接 F_1 和 F_0 的柄的一部分。γ 亚基的其余部分以及整个 σ 和 ε 亚基在该 X 射线结构图中未能看到。

516

F_1 的 α 和 β 亚基的环状排列和结构相似性使它同时具有假三折和假六折旋转对称性(图 17-20c)。不过,由于 γ 亚基的存在,也因为每对 α 和 β 亚基采取不同的构象(因之具有不同的底物亲和性),该蛋白质是不对称的。尽管α亚基也与ATP结合,但由β亚基催化ATP合成反应。

结合变化机制

通过质子泵 ATP 合酶催化的 ATP 合成机制可以大致分为 3 个阶段:

1) 由 F_0 进行的质子移位。

2) 由 F_1 催化形成 ATP 的磷酸酐键。

3) 由 F_1 和 F_0 相互作用导致的质子梯度消减与 ATP 合成偶联。

Paul Boyer 提供了支持 ATP 形成机制的有效证据。按照这个**结合变化机制**(binding change mechanism),F_1 具有 3 个相互作用的催化原体(αβ 亚基),其构象状态各不相同:一个与底物、产物松散结合(L 态),一个与底物、产物紧密结合(T 态),还有一个根本不与之结合(开放态或 O 态)。*质子移位释放的自由能使这 3 种状态相互转变*。ATP 的磷酸酐键只在 T 态形成,而 ATP 释放只能在 O 态进行。该反应包括 3 个过程(图 17-21):

1) ADP 和 P_i 结合到松散态(L)结合位点(在图 17-20 中命名为 β_{DP})。

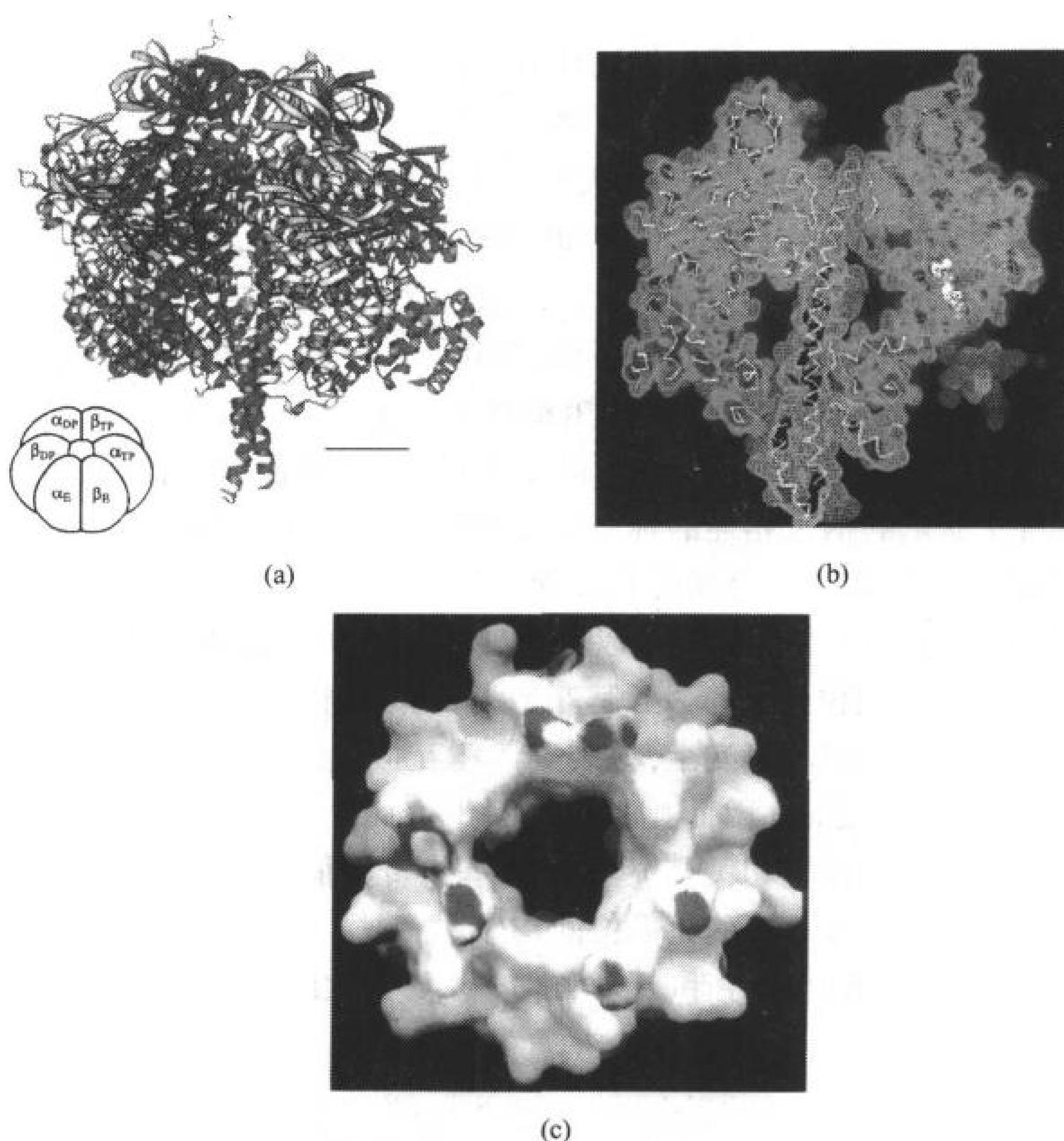


图 17-20　牛心脏线粒体的 F_1-ATP 酶的 X 射线结构图

(a)条带图中α、β和γ亚基分别用红黄蓝色表示。插图表明这些亚基在图中的定位。线条长20 Å。(b)蛋白的电子密度的横切面图(α、β亚基是蓝色,γ亚基是橘红色)。这些亚基的其余 C_α 骨架是黄色的。一个结合的 ATP 类似物被涂满颜色(C 黄色,N 蓝色,O 红色)。(c)从 a 和 b 顶部观察到的 $\alpha_3\beta_3$ 装配体的近似对称的排列。表面按照其电位涂以颜色,正极蓝色,负极红色。应注意该筒状结构的内表面不带电荷。与该筒相联的γ亚基的 C 端螺旋部分似乎也没有电荷。[引自 Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., and Walker, J. E., Nature 370, 623and 627(1994)]

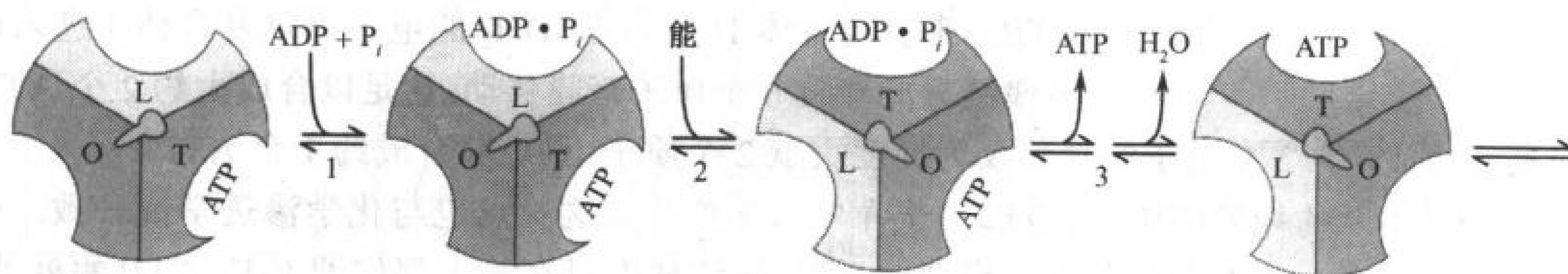


图 17-21　功能的秘诀:ATP 合酶的结合变化机制

F_1 有三个化学相似但构象截然不同的相互作用的 αβ 原聚体:O,开放构象对配体的亲合力很低,无催化活性,L 与配体松散结合也无活性;T 与配体紧密结合并有催化活性。ATP 合成分三个阶段:(1)ADP 和 P_i 结合到 L 位点。(2)发生耗能的构象改变,结合位点 L 转化为 T,T→O,O→L。(3)ATP 在 T 位点合成并从 O 位点释放。经过两轮以上该反应程序后酶恢复到初始状态。驱动构象转变的能量显然通过 γδε 配体的转动传递给催化配体 $\alpha_3\beta_3$,由位于中心的不对称体(绿色)再传送。[引自 Cross, R.L., Annu. Rev. Biochem. 50, 687(1980)]

2) 一个由自由能驱动的构象变化将 L 态结合位点转变成紧密态(T)结合位点(命名为 β_{TP}),后者催化 ATP 形成。这一步还包含其他 2 个原体的构象变化,即含有 ATP 的 T 位点转变为开放态(O)位点(命名为 β_E)和 O 位点再转变为 L 位点。

3) ATP 在一个亚基的 T 位点合成,而从另一亚基的 O 位点解离。由质子流提供的自由能首先促使新合成的 ATP 从酶上释放,即驱动 T 位点转变成 O 位点,因而破坏酶-ATP 相互作用,该作用曾促使 ADP 和 P_i 在 T 位点自发形成 ATP。

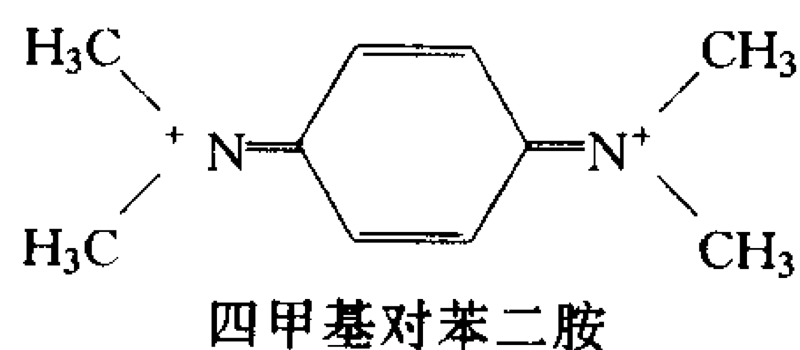
517

质子传递释放的自由能是如何与 ATP 合成偶联的? Boyer 根据结合变化机制的周期性提出一个假说,认为*结合变化是由催化装配体 $\alpha_3\beta_3$ 相对于 F_1F_0-ATP 酶其他部分转动所驱使*。直接观察这种转动的实验支持了这一假说:将 F_1 的 $\alpha_3\beta_3\gamma$ 装配体的顶部附着在玻璃片上,并在荧光显微镜下观察一根与 γ 亚基的柄区相连的标有荧光的肌肉肌动蛋白纤维。当有 ATP 存在时,可以看到肌动蛋白纤维的转动,而且总是顺时针方向。

γ 亚基是如何相对于 $\alpha_3\beta_3$ 装配体转动以及该转动又是如何促使 ATP 合成的? F_1 的 X 射线结构表明 γ 亚基的 C 端序列位于 α 和 β 亚基环型排列体的中心,这使人联想到圆筒状轴承在套筒中转动的情形(图 17-20a、b)。事实上,该装配体相互接触的疏水表面没有妨碍其自由转动的氢键和离子相互作用(图 17-20c),因而显得比较平滑。此外,F_1 的 3 个催化部位之间的构象差异与 γ 亚基不对称的底部的位置相关。显然,γ 亚基的转动很像汽车引擎的偏心轮,为了应对质子流过 F_0 通道,机械地诱导 β 亚基催化部位的构象改变。1 个质子通过 F_0 通道诱导 F_1 中一次构象变化(120°的旋转),因此由 ADP 和 P_i 合成 1 个 ATP 大约需要 3 个质子。

C. P/O 比

ATP 合成与质子梯度紧密偶联,也就是说,ATP 合成需要质子梯度的消减,没有 ATP 合成时,质子梯度是不会消减的。质子梯度是通过线粒体内膜的电子传递复合体的活性建立的。因此可以使用被氧化的底物分子的量来表述合成的 ATP 的数量。用分离的线粒体进行的实验表明,NADH、$FADH_2$ 和**四甲基对苯二胺**(直接提供 1 对电子给复合体 IV)的氧化分别合成大约 3 个、2 个和 1 个 ATP。该化学计量关系称为 **P/O 比**(P/O ratio)(它将 ATP 合成量与被还原的氧的量相关联),这也与化学渗透学说相吻合:2 个电子通过复合体 I、III 和 IV 可导致 10 个质子移位进入膜间隙(图 17-8)。这 10 个质子通过 F_1F_0-ATP 酶流回基质释放的能量足以驱动合成大约 3 个 ATP。来自复合体 II 中的 $FADH_2$ 的电子绕过复合体 I 进入电子传递链只能导致 6 个质子跨膜移动,这足以合成大约 2 个 ATP。通过复合体 IV 的 2 个电子的迁移仅为梯度贡献 2 个质子,只足够合成约 1 个 ATP。



四甲基对苯二胺

518

在呼吸活跃的线粒体中,*P/O 比几乎肯定不是整数*。这一点也与化学渗透学说一致。生理物质的氧化在多个位点为跨膜质子梯度做贡献,而该梯度只在一个部位即 F_1F_0-ATP 酶处消减。因此,电子传递链中的任何成员转运出线粒体的质子数量不一定是 ADP 和 P_i 合成 ATP 所需质子的整数倍。此外,质子梯度的消减在一定程度上还由非特异的质子泄漏回基质和用于其他目的的质子消耗引起,例如将 P_i 转运进基质(节 17-1B)。如将 P_i 的转运纳入计算,则 ADP 和 P_i 每合成 1 个 ATP 消耗 4 个质子。

Peter Hinkle 重新验证 P/O 比后认为上述实际比值应约为 2.5、1.5 和 1。如果这些数值是正确的,则每分子葡萄糖氧化合成 ATP 的数量为 2.5 ATP / NADH × 10 NADH / 葡萄糖 +

1.5 ATP/$FADH_2$ × 2 $FADH_2$/葡萄糖 + 2 ATP/葡萄糖(来自柠檬酸循环) + 2 ATP/葡萄糖(来自糖酵解) = 32 ATP/葡萄糖，而不是习惯上由 P/O 比为 3、2 和 1 得到的数值 38。为一致性起见，我们将在本书中用数值 38 ATP / 葡萄糖，但需记住此数值是有争议的。

D. 氧化磷酸化解偶联

电子传递(NADH 和 $FADH_2$ 被 O_2 氧化)和氧化磷酸化(质子梯度驱动的 ATP 合成)通常是紧密偶联的。*这一偶联基于线粒体内膜的不通透性，致使电子传递时因 H^+ 转运产生的跨膜电化学梯度得以建立。*事实上，H^+ 重新进入基质的惟一途径是通过 ATP 合酶的 F_0 部分。在静息状态，当氧化磷酸化作用减弱时，跨线粒体内膜的电化学梯度增至能阻止进一步泵动质子的程度，从而抑制电子传递。当 ATP 合成增加，电化学梯度消减时，电子传递得以恢复。

近年来，发现一些化合物如 **2,4-二硝基苯酚(DNP)** 可以使电子传递与 ATP 合成"解偶联"。DNP 是一种亲脂性弱酸，中性的质子化形式容易透过内膜。在 pH 梯度中，它在膜的酸性一侧结合质子，扩散透过内膜后，在膜的碱性一侧释放质子，因此作为一种质子转运离子载体(节 10-4B)而破坏质子梯度(图 17-22)。化学渗透学说为解释这些**解偶联剂**(uncoupler)的作用提供了理性根据。*存在于线粒体内膜的一种可增加其对 H^+ 通透性的物质，提供一种消减质子电化学梯度而无需合成 ATP 的途径，使氧化磷酸化与电子传递解偶联。*所以解偶联作用允许电子传递在 ATP 合成受抑制时照常进行。随后在 20 世纪 20 年代，DNP 被用作"减肥药"，它确实可以有效地减轻体重，但通常也引起致命的副作用。在生理条件下，*由电子传递产生却与 ATP 合成解偶联的 H^+ 电化学梯度的消减会产生热量*(见框 17-3)。

519

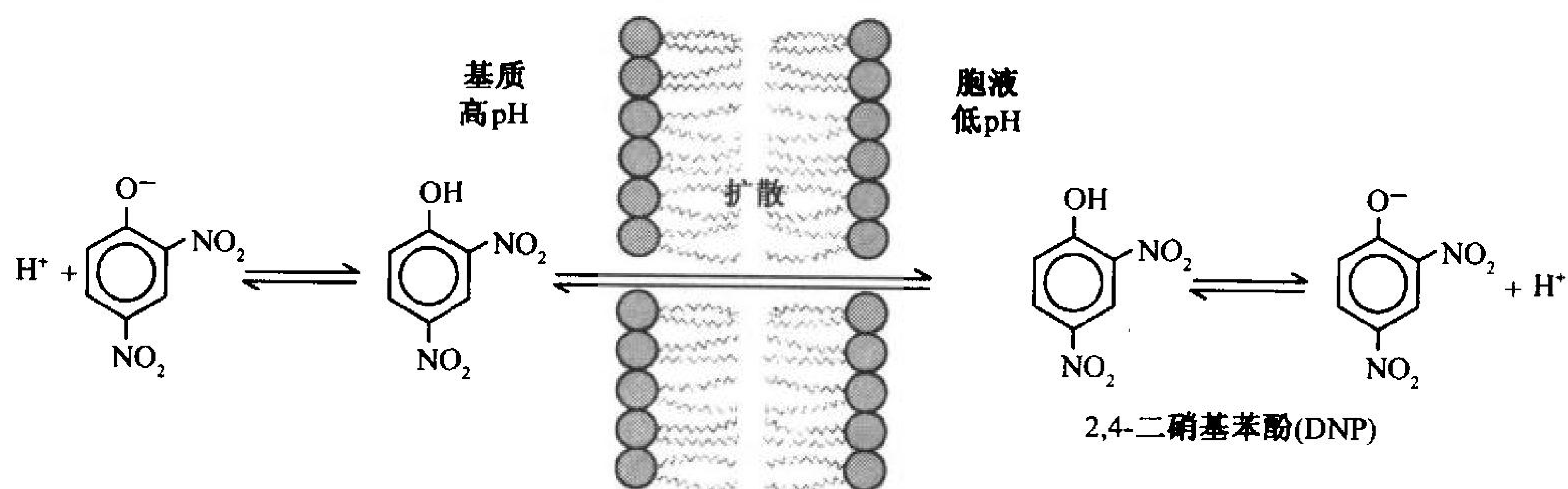


图 17-22　2,4-二硝基苯酚的作用

转运质子的离子载体如 DNP 能够通过消减电子传递产生的电化学梯度将氧化磷酸化与电子传递解偶联。

4. ATP 形成的调控

每天一个成年女性约需要 1500～1800kcal(6300～7500 kJ)的代谢能量。这相当于多于 200molATP 水解为 ADP 和 P_i 释放的自由能。然而任何时候体内现存的 ATP 总量都小于 0.1mol；显然，这种小额的 ATP 供应必须不断地再循环。正如我们所知，在有氧条件下以糖类作为能源时，这种再循环包括糖原分解、糖酵解、柠檬酸循环和氧化磷酸化。

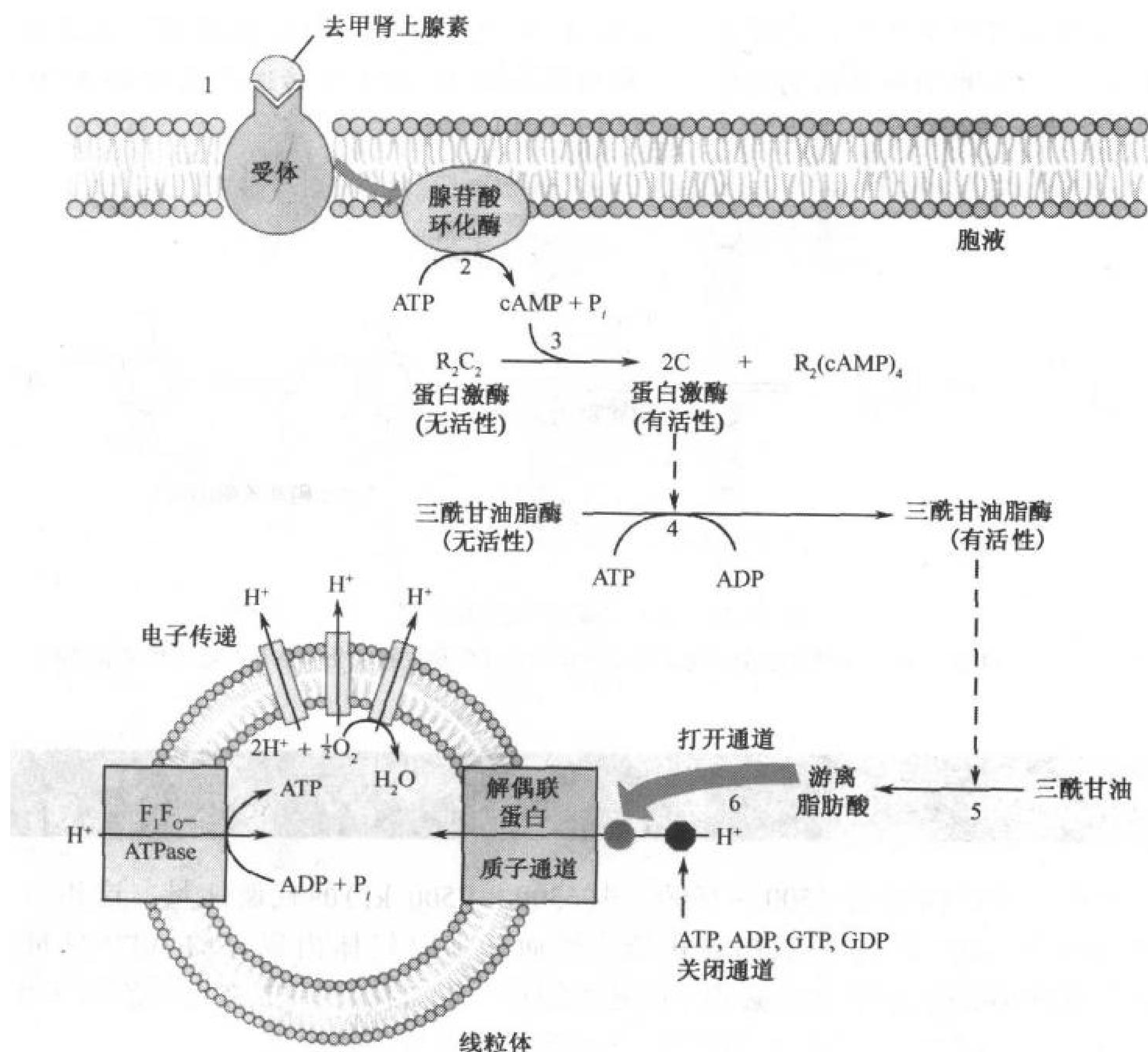
框 17-3 生物化学焦点

棕色脂肪组织的解偶联产热

棕色脂肪组织(棕色脂肪)的生理功能是产热。不像典型的(白色)脂肪组织,这种组织含有丰富的线粒体,其细胞色素使之呈棕色。新生无毛的哺乳动物,如人,还有冬眠哺乳动物,在颈部和上背部都有棕色脂肪,通过非震颤产热(在震颤或其他运动时,肌肉收缩,发生 ATP 水解也会产热)。

棕色脂肪产热的机理涉及氧化磷酸化有调控的解偶联。棕色脂肪组织线粒体含有称之为"解偶联蛋白"(UCP,又称产热蛋白)的质子通道,其他组织的线粒体没有这种蛋白。在耐冷动物中 UCP 含量高达占棕色脂肪组织线粒体内膜蛋白的 15%。经由 UCP 的质子流被生理浓度的嘌呤核苷酸(ADP、ATP、GDP、GTP)抑制,但是游离脂肪酸能克服这种抑制。

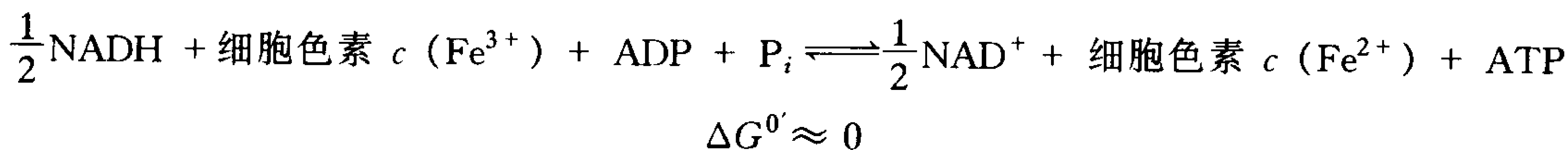
棕色脂肪线粒体的产热是在激素控制下(见下图),去甲肾上腺素(1;noradrenalin,也称去甲肾上腺素)诱导产生第二信使 cAMP (2),激活 cAMP 依赖性蛋白激酶(3;见节 15-3C),然后该激酶通过磷酸化激活激素敏感性三酰甘油脂酶(4),激活的脂酶水解三酰甘油脂产生游离脂肪酸以对抗嘌呤核苷酸对 UCP 的抑制作用(6)。经由 UCP 产生的质子流消除了跨线粒体内膜的质子梯度。这样进行着底物氧化(和产热)而不合成 ATP。



当然，ATP 的需求也不是恒定的。睡眠和剧烈活动时 ATP 消耗率相差 100 倍。*ATP 生成途径的代谢活性受到严格的协同调控，以使 ATP 的生成不会陡然高于需求。*我们已经讨论过糖酵解、糖原分解和柠檬酸循环的调控机制（节 14-4、节 15-3 和节 16-4）。在这一节中，我们将讨论调控氧化磷酸化速率的机制。

A. 氧化磷酸化的调控

在我们所讨论的代谢途径中，已知其中大部分反应近乎平衡地进行。少数几个不可逆反应构成了这些途径的潜在调控点，它们通常由处于变构调节下的调控酶所催化。在氧化磷酸化作用中，由 NADH 到细胞色素 c 途径的反应接近平衡：



$$\frac{1}{2}\text{NADH} + \text{细胞色素 } c\ (\text{Fe}^{3+}) + \text{ADP} + \text{P}_i \rightleftharpoons \frac{1}{2}\text{NAD}^+ + \text{细胞色素 } c\ (\text{Fe}^{2+}) + \text{ATP}$$

$$\Delta G^{0'} \approx 0$$

因此

$$K_{\text{eq}} = \left(\frac{[\text{NAD}^+]}{[\text{NADH}]}\right)^{1/2} \frac{[c^{2+}]}{[c^{3+}]} \frac{[\text{ATP}]}{[\text{ADP}][\text{P}_i]}$$

所以如添加产物 ATP，该反应容易逆向进行。然而，*细胞色素 c 氧化酶的反应（电子传递链的末端步骤）是不可逆的，因而是一个潜在的调控位点。*相对于大多数调控酶系统，细胞色素 c 氧化酶似乎主要由其底物之一的还原态细胞色素 c（c^{2+}）的有效浓度调控。因为 c^{2+} 与偶联的氧化磷酸化系统的其余部分保持平衡，所以 c^{2+} 的浓度最终依赖于线粒体内的 [NADH] / [NAD$^+$] 比和 [ATP] / [ADP][P$_i$] 比 [这后一个量值称为 **ATP 质量作用比**（ATP mass action ratio）]。经整理，前述公式可表示为：

521

$$\frac{[c^{2+}]}{[c^{3+}]} = \left(\frac{[\text{NADH}]}{[\text{NAD}^+]}\right)^{1/2} \frac{[\text{ADP}][\text{P}_i]}{[\text{ATP}]} K_{\text{eq}}$$

[NADH] / [NAD$^+$] 比值越高，ATP 质量作用比越低，还原态细胞色素 c 的浓度就越高，因而细胞色素 c 氧化酶的活性也就越高。

生理活动的变化是如何影响该系统的？在处于静息状态的个体中，ATP 水解为 ADP 和 P$_i$ 的速率较低而 ATP 质量作用比较高，因而还原态细胞色素 c 的浓度低，氧化磷酸化的速率最小。增加活动性导致 ATP 水解为 ADP 和 P$_i$，从而减小 ATP 质量作用比并且增加还原态细胞色素 c 的浓度，这又导致电子传递和 ADP 磷酸化的速率增加。

线粒体基质中 ATP、ADP 和 P$_i$ 的浓度依赖于从胞质中运入这些底物的转运蛋白的活性。因此，ADP-ATP 转位蛋白和 P$_i$ 转运子可能在氧化磷酸化的调节中起作用。还有一些证据显示 Ca^{2+} 能够激活电子传递复合体，甚至还可能激活 ATP 合酶。这与许多其他表明 Ca^{2+} 直接促进氧化代谢过程的例证相一致。

B. 氧化代谢的协同调控

进入线粒体电子传递链的电子的初始来源是糖酵解、脂肪酸降解和柠檬酸循环。例如，每分子葡萄糖氧化就有 10 分子 NAD$^+$ 转变为 NADH（图 17-1）。勿庸置疑，糖酵解和柠檬酸循环的调控与氧化磷酸化的需求是相协调的。由腺苷酸或 NADH 或二者协同以及某些代谢物对糖酵

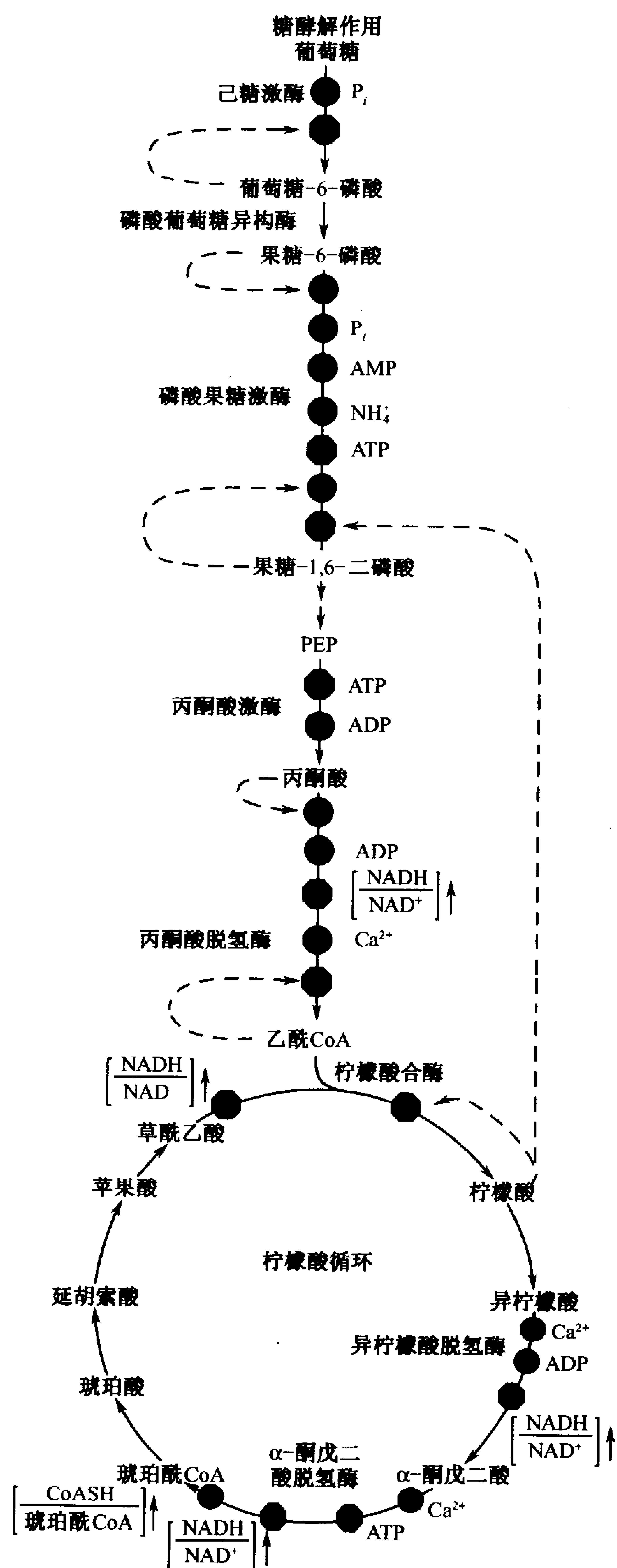


图 17-23 糖酵解和柠檬酸循环的调控

图表明 ATP、ADP、AMP、P_i、Ca^{2+}和[NADH/NAD]比率的影响(垂直箭头表明比率增加)。绿色圆点表示活化，红色八边形表示抑制。[引自 Newsholme, E. A. and Leech, A. R., Biochemistru for the Medical Sciences, pp. 316, 320, Wiley(1983)]

解和柠檬酸循环的调控点(磷酸果糖激酶、丙酮酸脱氢酶、柠檬酸合酶、异柠檬酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶)进行调节，保证电子传递链获得适量的电子供应(图 17-23)。

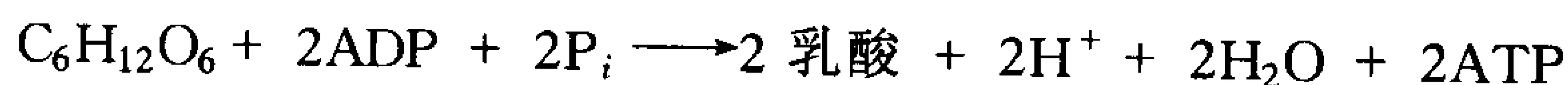
一个非常有趣的调节作用是柠檬酸对磷酸果糖激酶(PFK)的抑制。当对 ATP 的需求减少时，[ATP]增加而[ADP]降低。因为异柠檬酸脱氢酶是由 ADP 激活而 α-酮戊二酸脱氢酶则被 ATP 抑制，所以柠檬酸循环减缓，这引起柠檬酸浓度升高。柠檬酸通过一个特殊的转运系统离开线粒体，它一旦进入细胞质，又通过抑制 PFK 的活性而进一步抑制糖类降解。

522

5. 有氧代谢的生理意义

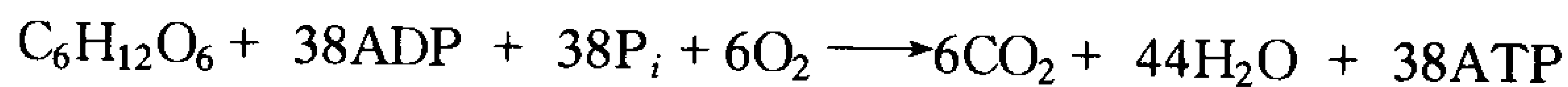
并非所有生物都能进行氧化磷酸化。然而，具有这种功能的生物确实能从有限量的代谢燃料中获取更多的能量。这一原理可以由 Pasteur 效应解释(节 14-3C)：当厌氧生长的酵母暴露在氧气中时，它们的葡萄糖消耗量陡然降低。一个类似的现象在哺乳动物肌肉中也观察到，当细胞转换为有氧代谢时，乳酸(肌肉无氧酵解的产物；节 14-3A)浓度显著降低。通过验证葡萄糖无氧降解和有氧降解(节 16-4)的化学计量式，很容易理解这些效应：

糖的无氧酵解：



$$C_6H_{12}O_6 + 2ADP + 2P_i \longrightarrow 2\text{ 乳酸} + 2H^+ + 2H_2O + 2ATP$$

葡萄糖有氧代谢：



$$C_6H_{12}O_6 + 38ADP + 38P_i + 6O_2 \longrightarrow 6CO_2 + 44H_2O + 38ATP$$

因此，糖有氧代谢产生 ATP 的效率为无氧酵解的 19 倍。

然而有氧代谢也有其缺点。许多生物和组织仅仅依靠有氧代谢，则当氧气缺乏时它们将遭受不可逆转的损伤(框 17-4)。有氧代谢还伴随产生少量活性氧代谢物，长时间可能破坏细胞成分。显然，在过去 20 亿年中(这期间地球的大气中含有相当数量的 O_2)生存的生物显示出了生理和生物化学的适应性，使它们能够利用O_2的氧化能量而将氧气本身潜在的危险降至最低。

框 17-4　健康和疾病的生物化学

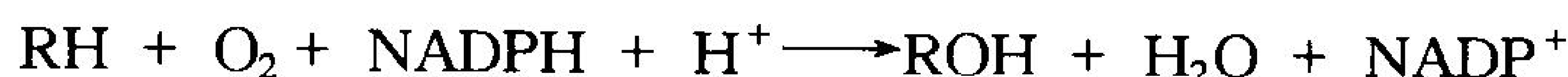
心脏衰竭和中风与氧耗竭

正如框 2-1 和框 7-1 所介绍的，大于 1mm 厚度的有机体需要循环系统运输营养到细胞和处理细胞产生的废物。除此之外，大部分大的生物体中循环体液包含有专事氧输运的蛋白质(如血红蛋白)，氧运输系统的精细和它们有效的调控是它们的基本特性和它们长期的演化相一致的。

当氧被耗尽时会发生什么事情呢？以下讨论造成人死亡的两种普通的疾患，心肌衰竭(心脏衰竭)和中风，这两种疾患分别是心脏和脑的血(氧)供应被断绝而引起的。在缺氧时，细胞必然转而只能依赖于糖酵解来产生 ATP，迅速耗竭磷酸肌酸(快速产生 ATP 的来源；节 13-2c)和糖原的储存。当 ATP 的产率降低到膜离子泵为维持胞内适宜的离子浓度所需要的供给水平以下时，渗透压平衡被打破，导致细胞和膜包被的细胞器开始肿胀。由此过度撑扯的膜变成可通透的，从而泄漏其内容物。基于这个道理，心肌衰竭的一个有力判据是血液出现心脏特异性酶，如 H 型乳酸脱氢酶(节 13-1B)，它们是由坏死的心脏组织泄漏出来的。另外，伴随无氧酵解而降低胞内 pH(由于产生乳酸)使得释放出的溶酶体酶(只在酸性 pH 下有活性)得以降解细胞内容物。这样，氧的耗竭不仅导致丧失细胞活性而且引起细胞不可逆损伤和细胞死亡。心脑这样快速进行呼吸的组织对氧耗竭引起的损伤特别敏感。

A. 细胞色素 P450

分子氧的存在演化出一个庞大的氧化解毒酶家族，总称为**细胞色素 P450**。这些酶将疏水分子羟化为溶解性更大的物质。根据其 DNA 序列，至少已经知道几百种细胞色素 P450 酶。这个庞大的酶家族催化 NADPH 和 O_2 参与的羟化反应。



$$RH + O_2 + NADPH + H^+ \longrightarrow ROH + H_2O + NADP^+$$

其中 RH 代表任何一种底物。

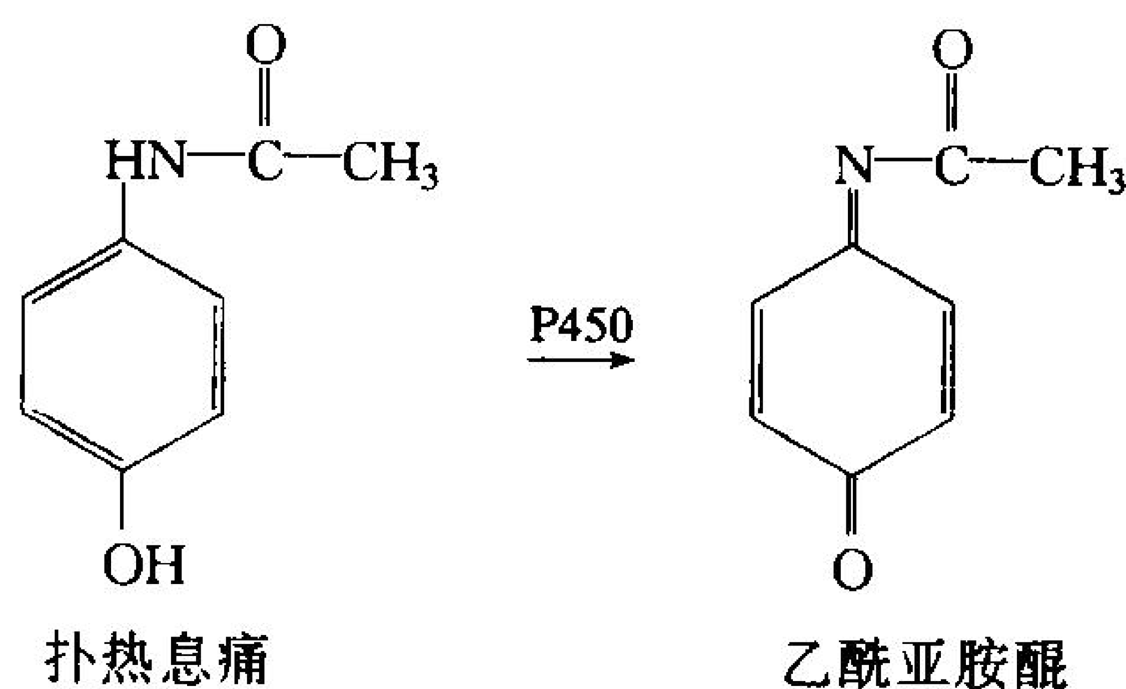
图 17-24　来自 *Pseudomonas putida* 标明了活性部位的细胞色素 P450 的 X 射线结构图
其铁原子与半胱氨酸侧链轴向配位的血红素辅基和酶的疏水性底物硫代莰酮用球-棒标明，N 蓝色，O 红色，S 黄色，Fe 橘红色，血红素的 C 原子，它的配体半胱氨酸侧链和硫代莰酮分别用绿色，灰色和浅绿色表示。与铁的配位键用白色表示。（引自 an X-ray structure by Thomas Poulos, University of California at Irvine）

假单胞菌的细胞色素 P450 的 X 射线结构示于图 17-24。所有已知的细胞色素 P450 都含有 400～530 个氨基酸和一个结合于活性部位的血红素基团。血红素的 Fe 原子在中轴位置与一个存留的 Cys 残基和一个水分子配位。当底物与酶结合时，O_2 替代水分子与 Fe 结合。当 CO 与 Fe 结合时，该酶的吸收波长为 450nm，因之得名。

523

各种细胞色素 P450 的多数底物是亲脂性化合物，它们的积累将毒害细胞。这类分子包括多环芳烃（其中有些是致癌物）、多氯联苯（PCB_S）、苯巴比妥和类固醇。由细胞色素 P450 催化的羟化反应将这些分子转化为更为可溶的物质以便于排泄。

关于细胞色素 P450 的一个最为有趣的方面是其底物通常通过提高基因转录速率来诱导该酶的合成。这种自我诱导提供了一种有效的解毒机制。一系列研究表明细胞色素 P450 酶已经发展成为一种防御物种间化学冲突的机制。或许，这些酶的重要功能也可能是非常平常的，例如，将脂肪酸或类固醇转化为更具生物活性的形式。当然，这种相同作用也可能将相对无毒的物质转化为更具毒性的化合物。例如，细胞色素 P450 能够氧化广泛使用的止痛药**扑热息痛**（acetaminophen）。



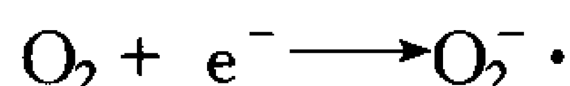
该反应的产物是一种强亲电子试剂，与谷胱甘肽（框 14-3）和细胞蛋白的巯基反应，引起高剂量扑热息痛肝中毒（上述反应在药物的治疗剂量范围内没有意义）。

524

B. 活性氧种类

尽管由细胞色素 *c* 氧化酶催化的 O_2 的 4 电子还原反应几乎总是快速而准确地稳妥进行，但偶而 O_2 只被部分还原，产生易于与各种细胞成分反应的氧的衍生物。最著名的活性氧是**过氧**

化物自由基(superoxide radical)：



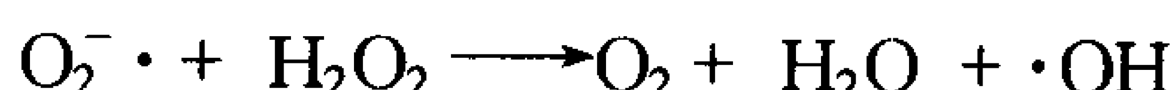
$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^- \cdot$$

过氧化物自由基是其他活性物质的前体。$O_2^- \cdot$质子化产生$HO_2 \cdot$，一种比$O_2^- \cdot$强得多的氧化剂。生物体系中最强的氧化剂种类可能是羟自由基，它来自于相对无毒的过氧化氢(H_2O_2)。



$$H_2O_2 + Fe^{2+} \longrightarrow \cdot OH + OH^- + Fe^{3+}$$

羟自由基也可由过氧化物与H_2O_2反应而形成：



$$O_2^- \cdot + H_2O_2 \longrightarrow O_2 + H_2O + \cdot OH$$

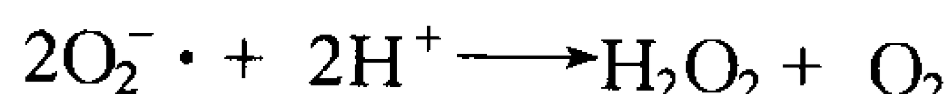
尽管大多数自由基极为短命($O_2^- \cdot$的半衰期为1×10^{-6} s，而$\cdot OH$的半衰期为1×10^{-9}s)，但它们很容易从其他分子获取电子，将其转变为自由基，从而引发一系列反应。

自由基攻击的随机特性，使得难以定性它们的反应产物，但所有种类的生物分子对自由基引起的氧化损伤均很敏感。细胞中多不饱和脂的氧化可能破坏生物膜的结构，而DNA的氧化损伤则可能导致点突变。酶功能也可能因与氨基酸侧链发生的自由基反应而被损害。因为线粒体是细胞氧化代谢的重要场所，其脂类，DNA和蛋白质都可能因自由基引起的损伤而遭受破坏。

几种退化性疾病，包括**Parkinson疾病**、**Alzheimer疾病**和**Huntington疾病**，都与线粒体的氧化损伤有关。这些观察导致了衰老的自由基理论，它认为*正常氧化代谢过程中引起的自由基反应至少部分地与衰老过程有关*。事实上，线粒体DNA具有先天性缺陷的个体表现了各种典型的衰老症状，包括神经运动困难、耳聋和痴呆。他们的遗传缺陷可能使其线粒体对电子传递体系产生的活性氧类都更加敏感。

C. 抗氧化剂作用机制

抗氧化剂(antioxidant)破坏氧化性自由基如$O_2^- \cdot$和$\cdot OH$。1969年，Irwin Fridovich发现存在于几乎所有细胞中的**超氧化物歧化酶(SOD)**催化$O_2^- \cdot$转变为H_2O_2的反应。



$$2O_2^- \cdot + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2$$

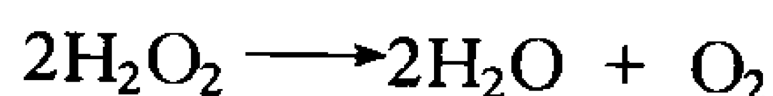
线粒体和细菌的SOD都是含锰的四聚体；真核生物细胞质的SOD是一个含有铜和锌离子的二聚体。非酶促过氧化物降解速率约为$2 \times 10^5 (mol \cdot L^{-1}) \cdot s^{-1}$，而Cu，Zn-SOD催化的反应速率约为$2 \times 10^9 (mol \cdot L^{-1}) \cdot s^{-1}$。这一速率接近于扩散控制的极限(节12-1B)，它的形成显然是因带负电的过氧化物底物借静电作用进入酶活性部位而获得的(图17-25)。活性部位的铜离子位于每个酶分子亚基的一个深口袋的底部。口袋入口处由Glu123、Glu133、Lys136和Thr137组成的氢键网络帮助$O_2^- \cdot$扩散到Cu离子和一个Arg残基之间的位置。

525

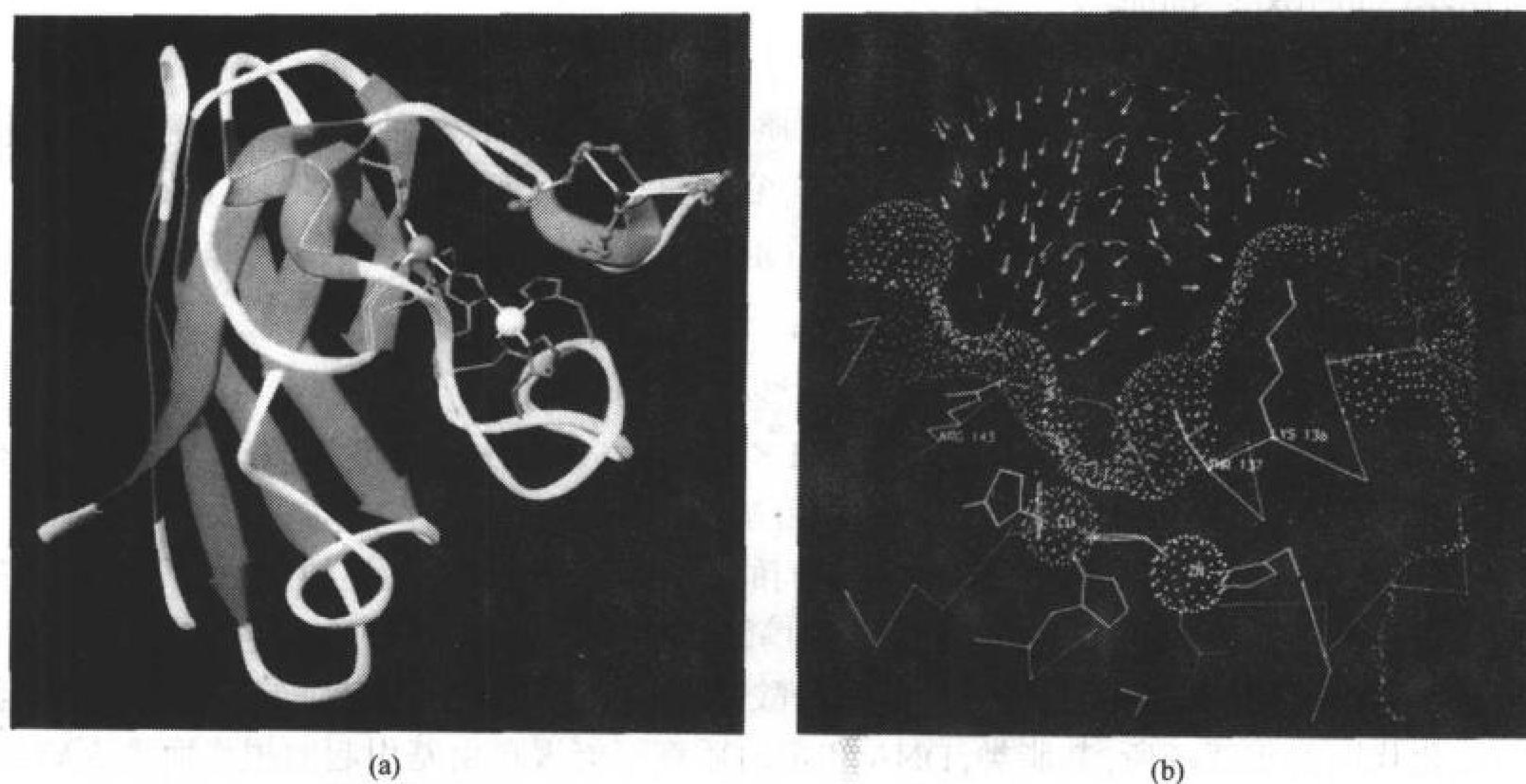
有些患有遗传性**肌萎缩外侧硬化症**(ALS；Lou Gehrig疾病)的个体具有一种突变的Cu，Zn-SOD。酶中的多数突变都会导致功能丧失。然而ALS个体中的缺陷却以一种显性方式遗传，这与某些毒性作用的产生有关。事实上，突变的SOD作为一种过氧化物酶被认为能够氧化脂类，导致病人出现特有的运动神经元退化。通过构建带有人类突变SOD基因的基因工程鼠，涉及这一衰老现象的研究已开始进行。许多能够减轻SOD突变影响的化合物可以在这些动物模型中进行体内试验。

SOD被认为是防御活性氧族的第一道屏障。反应产生的H_2O_2(它可能引发系列反应产生其他活性氧种族)，被酶如**过氧化氢酶**(catalase)降解为水和氧气，该酶促反应为：

526



$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2$$

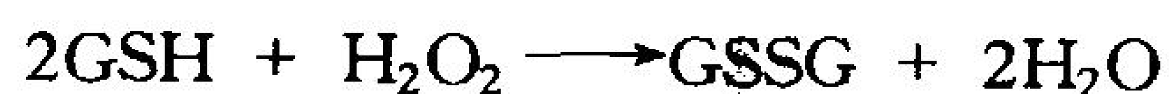


(a) (b)

图 17-25 人的 Cu, Zn 超氧化物歧化酶的电效应

(a)二聚体酶的一个亚基的 X 射线结构图。多肽骨架按照其二级结构着以颜色,Cu 和 Zn 离子分别用橘红色和银色小球表示,与这些金属离子配位的侧链用棒条表示,在活性中心囊入口处形成的氢键网用球和棒表示。金属配位键和氢键用细白线表示。(引自 X-ray structure by John Tainer, The Scripps Research Institute, La Jolla, California)(b)Cu, Zn-SOD 的活性中心槽的横切面图。其分子表面用斑点表示,斑点按电荷着以不同颜色,红色,最负;黄色,负;绿色,中性;浅蓝色,正;深蓝色,最正。电场载体用相似颜色的箭头表示。O_2^-·结合部位位于 Cu 离子和 Arg 143 的侧链之间。(引自 Elizabeth Getzoff, The Scripps Research Institute, La Jolla, California)

而谷胱甘肽过氧化物酶(框 14-3)是以谷胱甘肽(GSH)为还原剂,其反应为:



$$2GSH + H_2O_2 \longrightarrow GSSG + 2H_2O$$

谷胱甘肽过氧化物酶还能催化有机氢过氧化物降解。某些谷胱甘肽过氧化物酶需要 Se 作为激活剂,这也是为什么 Se 显示出抗氧化活性的一个原因。

小　　结

1. 在还原氧分子之前,来自还原态辅酶 NADH 和 $FADH_2$ 的电子流经电子传递链的一系列氧化还原中心。在电子转移中,质子被转位于线粒体外形成电化学梯度,其自由能驱动 ATP 合成。
2. 线粒体含有用于氧化代谢的可溶性和与膜结合的酶。借助穿梭系统,还原当量由胞浆输入。特殊的输运载体介导 ADP、ATP、P_i 和 Ca^{2+} 的跨膜运动。
3. 电子由带有更负还原势的氧化还原中心流向带有更正的还原势的氧化还原中心。抑制剂被用以揭示电子载体的排列次序和电子进入电子传递链的入口处。
4. 电子输运由单电子载体(铁-硫簇,细胞色素和铜离子)和双电子载体(CoQ, FMN, FAD)介导。
5. 复合物 I 从 NADH 转移 2 个电子到 CoQ,并将 4 个质子转位到膜间隙。
6. 复合物 II 转移电子是从琥珀酸经由 FAD 交给 CoQ。
7. 复合物 III 从 $CoQH_2$ 转移 2 个电子给 2 分子细胞色素 *c*, Q 循环伴随运行把 4 个质子转位到膜间隙。
8. 复合物 IV 利用细胞色素 *c* 提供的 4 个电子和来自基质的 4 个质子,把分子氧还原为 2 分子水。对于每 2 个还原氧分子的电子来说,2 个质子被转位于膜间隙。

9. 依照化学渗透学说的解释，当电子经由复合物 I、III 和 IV 转位至膜间隙，建立了一个跨线粒体内膜的电化学梯度。
10. 质子经由 ATP 合酶(F_1F_0-ATPase)的 F_0 成分内流驱动它的 F_1 成分将 ADP + P_i 合成为 ATP，它是借助称之为“结合变化”(binding change)机制来完成的，这个过程是由 F_0 介导的 F_1 的 γ 亚基作相对于其具有催化作用的 $\alpha_3\beta_3$ 聚合体的旋转来驱动的。
11. P/O 比即每还原 1 个氧原子所产生的 ATP 的数目不一定是整数。
12. 质子梯度消除剂能够使氧化磷酸化与电子传递解偶联。
13. 氧化磷酸化由[NADH]/[NAD^+]之比和 ATP 的质量作用比来调控。根据对氧化磷酸化的需求来协调糖酵解和柠檬酸循环。
14. 氧分子的氧化力使得机体从代谢燃料中获得比无氧作用所产能量更多的能量，并且将氧分子用于由细胞色素 P450 催化的去毒反应中。
15. 在有氧代谢中氧分子的不完全还原产生了活性氧如超氧阴离子和羟自由基。由自由基反应引起的氧化损害可能是衰老退变和某些疾病的原因。超氧化物歧化酶帮助抵御自由基。

参考文献

Abrahams, J.P., Leslie, A.G.W., Lutter, R., and Walker, J.E., Structure at 2.8 Å resolution of F_1-ATPase from bovine heart mitochondria, *Nature* **370,** 621–628 (1994).

Beinert, H., Holm, R.H., and Münck, E., Iron-sulfur clusters: Nature's modular multipurpose structures, *Science* **277,** 653–659 (1997).

Boyer, P.D., The ATP synthase—A splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.* **66,** 717–749 (1997).

Brown, G.C., Control of respiration and ATP synthesis in mammalian mitochondria and cells, *Biochem. J.* **284,** 1–13 (1992).

Cramer, W.A. and Knaff, D.B., *Energy Transduction in Biological Membranes,* Springer-Verlag (1991). [The first three chapters of this advanced textbook summarize the thermodynamics of biochemical processes in general and redox reactions in particular.]

Friedrich, T., Steinmüller, K., and Weiss, H., The proton-pumping respiratory complex I of bacteria and mitochondria and its homologue of chloroplasts, *FEBS Lett.* **367,** 107–111 (1995).

Hinkle, P.C., Kumar, M.A., Resetar, A., and Harris, D.L., Mechanistic stoichiometry of mitochondrial oxidative phosphorylation, *Biochemistry* **30,** 3576–3582 (1991). [Describes measurements of the P/O ratios indicating that their values are 2.5, 1.5, and 1.]

Junge, W., Lill, H., and Englebrecht, S., ATP synthase: An electrochemical transducer with rotatory mechanics, *Trends Biochem. Sci.* **22,** 420–423 (1997).

Lanyi, J.K., Bacteriorhodopsin as a model for proton pumps, *Nature* **375,** 461–463 (1995).

Michel, H., Behr, J., Harrenga, A., and Kannt, A., Cytochrome *c* oxidase: Structure and spectroscopy, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27,** 329–356 (1998).

Nicholls, D.G. and Ferguson, S.J., *Bioenergetics 2,* Academic Press (1992). [An authoritative monograph on the mechanism of oxidative phosphorylation and the techniques used to elucidate it.]

Trumpower, B.L. and Gennis, R.B., Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: The enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation, *Annu. Rev. Biochem.* **63,** 675–716 (1994).

Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S., The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å, *Science* **272,** 1136–1144 (1996); *and* Yoshikawa, S., Beef heart cytochrome *c* oxidase, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7,** 574–579 (1997).

Walker, J.E., The regulation of catalysis in ATP synthase, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4,** 912–918 (1994).

Xia, D., Yu, C.-A., Kim, H., Xia, J.-Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L., and Deisenhofer, J., Crystal structure of the cytochrome bc_1 complex from bovine heart mitochondria, *Science* **277,** 60–66 (1997).

Yu, B.P., Cellular defenses against damage from reactive oxygen species, *Physiol. Rev.* **74,** 139–162 (1994).

关　键　词

氧化还原中心　redox center
ADP-ATP 转位蛋白　ADP-ATP translocator
自由基　free radical
质子驱动力　protonmotive force
嵴　cristae
电子传递　electrogenic transport
Q 循环　Q cycle
P/O 比　P/O ratio
线粒体基质　mitochondrial matrix
铁-硫蛋白　iron-sulfur protein
差示标记　differential labeling
解偶联剂　uncoupler

膜间隙 intermembrane space

细胞色素 cytochrome

F_1F_0-ATP 酶 F_1F_0-ATPase

ATP 质量作用比 ATP mass action ratio

苹果酸-天冬氨酸穿梭 malate-aspartate shuttle

辅酶 Q coenzyme Q

能量偶联 energy coupling

超氧自由基 superoxide radical

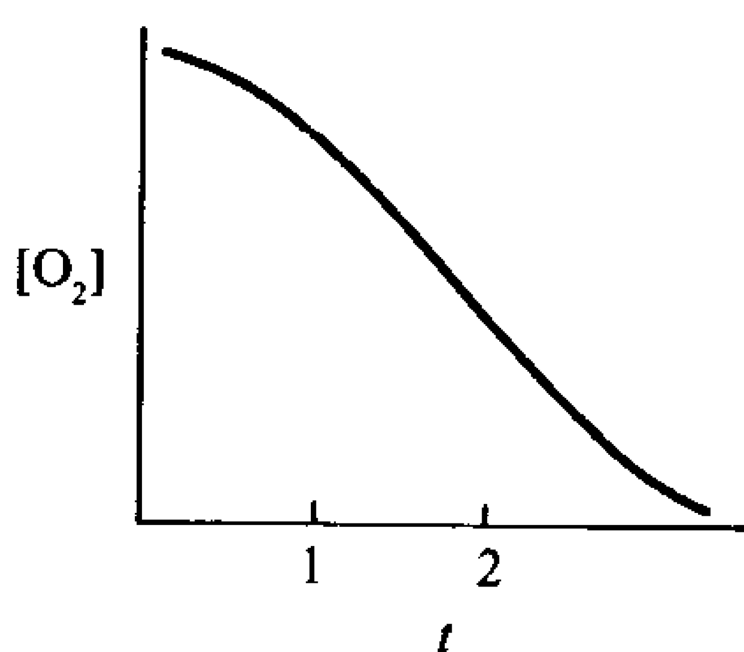
甘油磷酸穿梭 glycerophosphate shuttle

学习思考题

1. 叙述由葡萄糖流向氧分子的电子流通路。
2. 叙述一对电子如何被转移给单电子受体细胞色素 c。
3. 在复合物 I 和 IV 中,质子转移机理与在复合物 III 中有什么样不同。
4. 概述化学渗透学说。
5. 叙述 F_1F_0-ATP 酶的结合变化机制。
6. 解释对于一给定的底物,P/O 比为什么不一定是整数。
7. 解释氧化磷酸化是怎样与电子传递相联系的,并且这两个过程能够怎样被解偶联。
8. 基于氧分子的代谢有什么优点和缺点。

练 习 题

1. 解释为什么肝细胞线粒体中的嵴比心肌细胞线粒体少。
2. 在昆虫飞翔肌中,每个参与甘油磷酸穿梭的胞浆 NADH 可合成多少个 ATP? 比较一下 NADH 还原当量经苹果酸天冬氨酸穿梭转移到基质时产生的 ATP 量。
3. 计算游离 $FADH_2$ 被氧氧化时的 $\Delta G^{0'}$。假设处于标准状态,并且能量 100% 的得到利用,能够合成的 ATP 的最大数是多少?
4. 悬浮于良好缓冲体系中的含有过量 ADP 和 P_i 的线粒体稀溶液的耗 O_2 曲线如下:



画出如下曲线:(a)当 t = 1 时加入安密妥;(b) 当 t = 1 时加入安密妥,t = 2 时加入琥珀酸;(c) 当 t = 1 时加入 CN^-,t = 2 时加入琥珀酸;(d) 当 t = 1 时加入寡霉素,t = 2 时加入 DNP。

5. 为什么在一个电子传递复合体中电子可以从具有更正 $\varepsilon^{0'}$ 的氧化还原中心流向更负 $\varepsilon^{0'}$ 的氧化还原中心?
6. 用高频声波(**超声波**)作用于线粒体悬液,产生源于线粒体内膜的**亚线粒体颗粒**。这些膜性小体进行膜反转,这样线粒体的膜间隙成为亚线粒体颗粒的腔。(a)画出电子转移的过程以及这些粒子磷酸化的过程。(b)假定氧化磷酸化的底物过量存在,亚线粒体颗粒悬液的 pH 上升时,ATP 的合成是增加还是减少?
7. 解释一下为什么像 DNP 这样的化合物可增加代谢率。
8. 在棕色脂肪中,激素通过活化脂酶来刺激非震颤产热,而不是直接活化 UCP,其优势是什么?
9. 描述[NADH]/[NAD⁺]和[ATP]/[ADP]在厌氧向有氧转化的过程中的变化,它们的比率是如何影响糖酵解

和柠檬酸循环的？

10. 活化的中性粒细胞和巨噬细胞（两种白细胞）通过释放过氧化物来抵御细菌。这些细胞含有能够催化下列反应的 **NADPH 氧化酶**

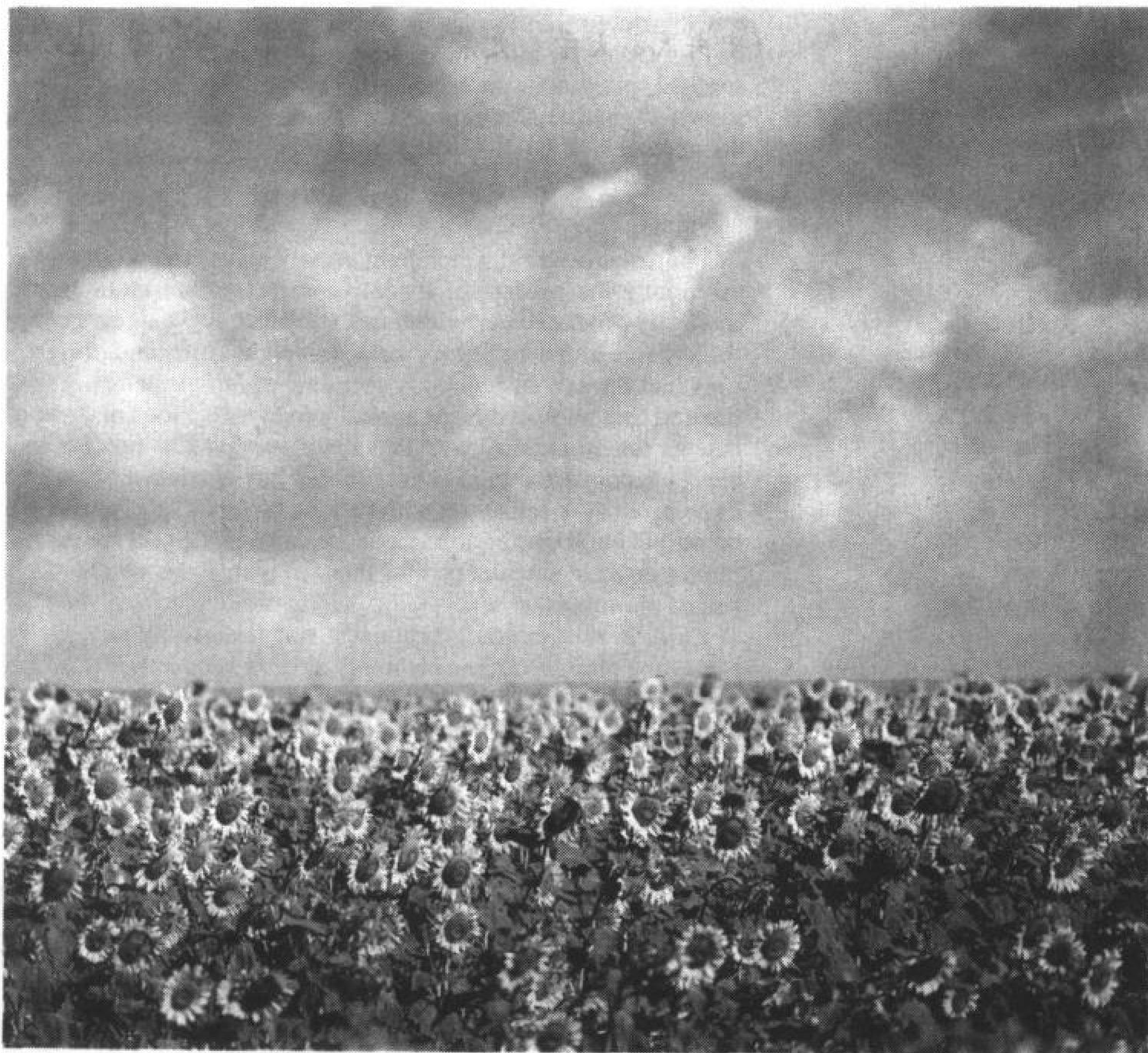


$$2O_2 + NADPH \longrightarrow 2O_2^- \cdot + NADP^+ + H^+$$

解释为什么这些细胞中通过葡萄糖-6-磷酸脱氢酶的反应会增强。

（中央民族大学　史景熙　译　清华大学　蔡国平　校）

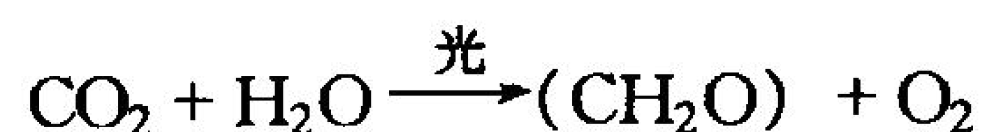
第18章　光合作用



像这些向日葵一样，植物可以完全靠水、空气和阳光生存。它们通过一个光驱动的过程将水氧化生成 O_2，并将空气中的 CO_2 转化为糖。（引自 Eric Horan/Gamma Liaison）

植物可以从非实体性的东西如阳光和空气中获得营养，这一点直到18世纪才被证实。Joseph Priestly 注意到，罐中的空气被点燃的蜡烛燃尽后，放入一株小小的植物，可以使罐中的空

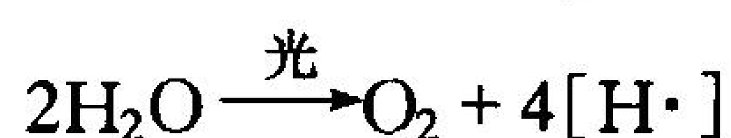
气得到“再生”，至此，才得到了植物可以产生维持生命的物质——O_2 的证据。在光照条件下，植物和蓝绿藻（*cyanobacteria*，正式的名称为 *blue-green algae*）消耗 CO_2 和 H_2O，产生 O_2 并以糖的形式“固定”碳：



$$CO_2 + H_2O \xrightarrow{\text{光}} (CH_2O) + O_2$$

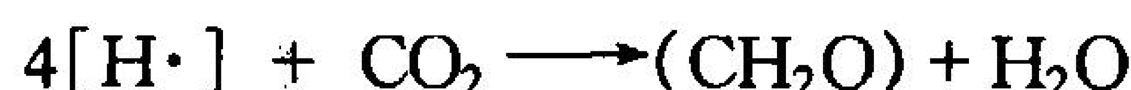
光合作用（photosynthesis），由光能驱动碳的还原，实质上是氧化性的糖代谢的逆反应。光合作用产生的糖既可以作为光合有机体的能源，也可以作为非光合有机体的能源，后者直接或间接地消耗光合有机体。据估计，光合作用每年可以固定约 10^{11}吨碳，相当于贮存了超过 10^{18}kJ 的能量。这个将光能转变为化学能的过程植根于进化的早期，其复杂性与其漫长的历史相一致。我们的讨论首先集中在紫色光合细菌上，因为它们的光合作用机器相对比较简单。然后讨论植物，其叶绿体是光合作用发生的部位。

20 世纪早期，曾错误地认为光合色素吸收的光直接还原 CO_2，然后与水结合形成糖。实际上，植物中的光合作用分为二个阶段，光能用于氧化 H_2O：



$$2H_2O \xrightarrow{\text{光}} O_2 + 4[H\cdot]$$

产生的还原剂，在这儿用[H·]表示，再去还原 CO_2：



$$4[H\cdot] + CO_2 \longrightarrow (CH_2O) + H_2O$$

光合作用的这两个阶段，传统上被称为**光反应**（light reaction）和**暗反应**（dark reaction）：

1）在光反应中，特定的色素分子捕获光能而被氧化。再经一系列电子传递反应最终将 $NADP^+$ 还原为 NADPH，产生的跨膜质子梯度中蕴含的能量促使 ADP + P_i 合成 ATP。氧化态的色素分子被 H_2O 还原，产生 O_2。

2）暗反应利用 NADPH 和 ATP 还原 CO_2，并将 CO_2 整合到糖的三碳前体分子中。

如同我们所看到的，这两个过程都在光照条件下发生，因此将它们分别称为依赖于光的反应和不依赖于光的反应更为恰当。在介绍叶绿体及其组成之后，我们将依次讨论光反应和暗反应。

1. 叶绿体

*在真核细胞（藻类和高等植物）中，光合作用在*__叶绿体__（chloroplast）*中进行*。每个细胞含 1～1000 个叶绿体，大小和形状各异，但典型的叶绿体为长约 5μm 的椭圆体。这些细胞器可能从光

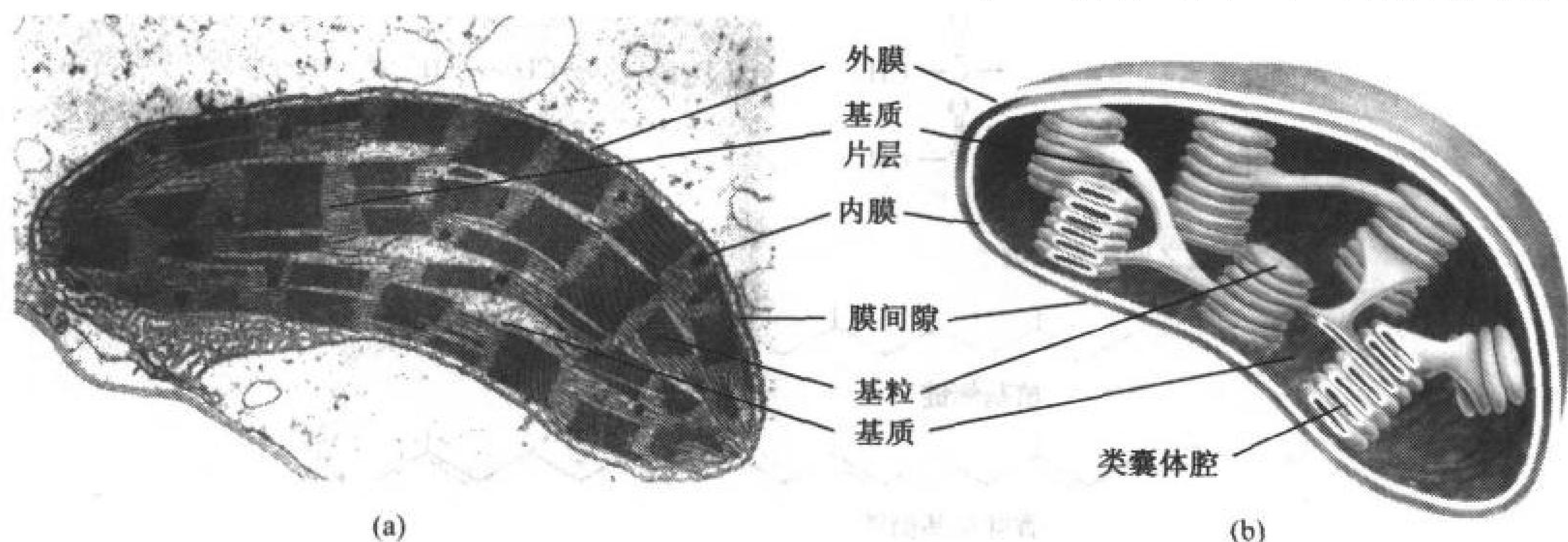


图 18-1　玉米的叶绿体

(a)电镜照片（引自 T. Elliot Weier）。(b)示意图

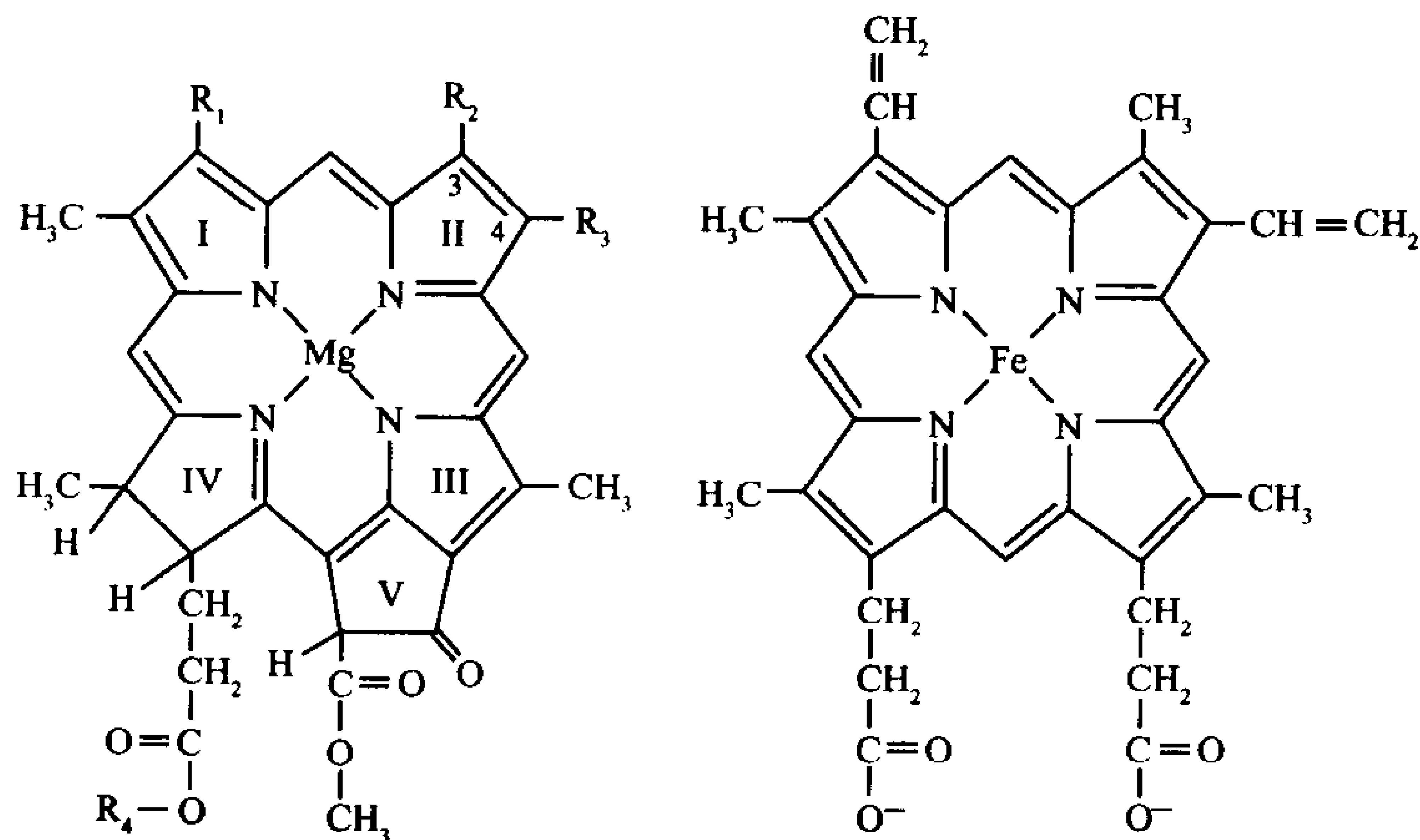
合细菌进化而来。

531

A. 叶绿体结构

叶绿体与线粒体有许多相似之处，像线粒体一样，叶绿体有一层高通透性的外膜和一层几乎不通透的内膜，内、外膜由狭窄的膜间隙隔开（图 18-1）。内膜包围着**基质**（stroma）部分，基质中含丰富的酶，包括糖合成所需要的酶。基质中还含有合成几种叶绿体蛋白所涉及的 DNA、RNA 和核糖体。

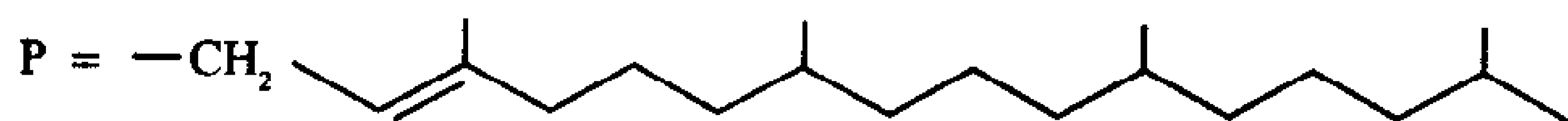
基质又包围着第三种膜结构：**类囊体**（thylakoid）（在希腊语中，thylakos 是囊或袋的意思）。虽然在多数有机体中类囊体似乎由盘状的被称为**基粒**（grana）的囊泡堆积而成，基粒之间由不相互堆叠的**基质片层**（stromal lamellae）相连，但是类囊体可能是一个单一的高度折叠的囊泡结构。一个叶绿体通常含有 10～100 个基粒。类囊体膜由叶绿体的内膜内陷折叠而成，因此与线粒体的嵴相似。类囊体膜含有捕获光能、传递电子和合成 ATP 所涉及的蛋白质复合物。在光合细菌中，光反应机器位于质膜上，通常形成内陷或类似基粒的多片层结构。



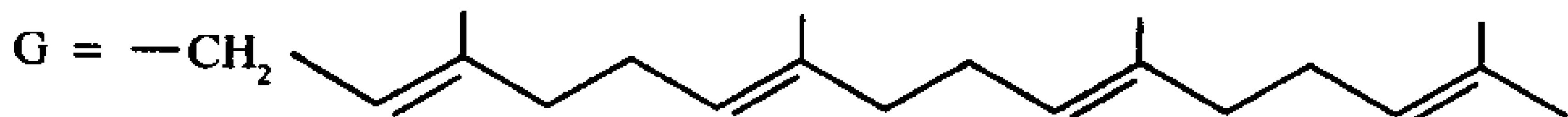
叶绿素　　　　铁-原卟啉IX

	R_1	R_2	R_3	R_4
叶绿素a	$-CH=CH_2$	$-CH_3$	$-CH_2-CH_3$	P
叶绿素b	$-CH=CH_2$	$-\overset{O}{\overset{\Vert}{C}}-H$	$-CH_2-CH_3$	P
细菌叶绿素a	$-\overset{O}{\overset{\Vert}{C}}-CH_3$	$-CH_3$[a]	$-CH_2-CH_3$[a]	P or G
细菌叶绿素b	$-\overset{O}{\overset{\Vert}{C}}-CH_3$	$-CH_3$[a]	$=CH-CH_3$[a]	P

[a] 在 C_3 和 C_4 之间没有双键

P = $-CH_2$


植基侧链

G = $-CH_2$


香叶草基侧链

图 18-2　叶绿素结构

叶绿素 a 和 b 以及细菌叶绿素 a 和 b 的分子式与铁-原卟啉Ⅸ（血红素）的分子式相比较。类异戊二烯植基和香叶草基尾巴可能增加了叶绿素在非极性介质中的溶解度。

B. 光合色素

光合作用中主要的光受体是**叶绿素**(chlorophyll),与血红蛋白以及细胞色素的血红素辅基(见节 7-1A 及框 17-1)一样,这个环状的四吡咯结构,是从原卟啉Ⅸ合成而来的。但是,叶绿素分子与血红素仍有差异(图 18-2)。叶绿素中,中心金属离子是 Mg^{2+} 而不是 Fe(II)或 Fe(III),而且一个环戊烷环——环 V,与吡咯环 III 融合。植物中主要的叶绿素形式**叶绿素 a**(chlorophyll a, Chla)和**叶绿素 b**(chlorophyll b, Chlb),蓝细菌中的主要形式**细菌叶绿素 a**(bacteriochlorophyll a, BChla)和**细菌叶绿素 b**(bacteriochlorophyll b, BChlb),与血红素以及它们彼此之间环 II 和环 IV 的饱和程度、环 I、II、III 的取代基也有所不同。 532

高度共轭的叶绿素分子以及其他光合色素可以强烈地吸收可见光(太阳辐射到达地球表面的最强形式;图 18-3)。不同的叶绿素之间相对较小的化学差异却大大影响了它们的吸收光谱。

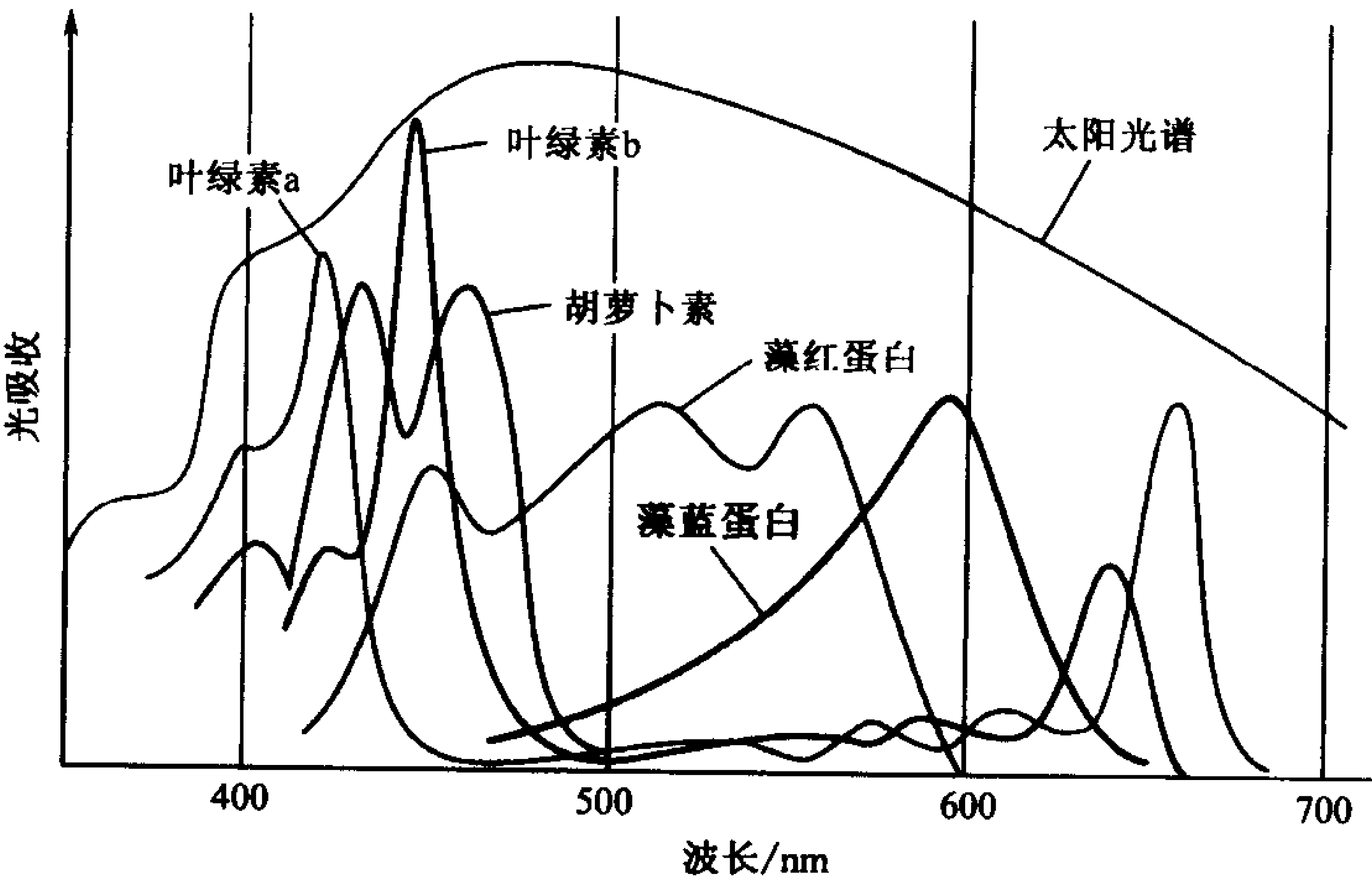


图 18-3 不同光合色素的吸收光谱

叶绿素有二个吸收带,一个在红光区(长波长),一个在蓝光区(短波长)。藻红蛋白吸收蓝光和绿光,而藻蓝蛋白吸收黄光。加在一起,这些色素可以吸收太阳光谱中的大多数可见光。(引自 Illinois 大学 Govindjee)

含多个色素的集光复合物

在节 18-2 B 中已经介绍过,光合作用的基本反应在**光合反应中心**(photosynthetic reaction center)进行。*然而在光合复合体中含有的叶绿素分子比反应中心所含的叶绿素分子要多得多,*这是因为大多数叶绿素分子并不直接参与光化学反应,而是起收集光能的作用,也就是说*作为集光天线*。这些**天线叶绿素**(antenna chlorophyll)将吸收的**光子**(photon)(光的单位)的能量从一个分子传给另一个分子,直至到达光合反应中心(图 18-4)。 533

能量从天线系统传递到反应中心只需不到 10^{-10}s,效率超过 90%。这种高效率取决于叶绿素分子间的合适距离和相对取向。即使在强日光下,一个反应中心每秒钟也只能直接截获约 1 个光子,这种速度在代谢上是无关紧要的。因此,天线色素复合物,或称**集光复合物**(light-harvesting complex, LHC)是必需的。 534

LHC 由一连串与膜结合的疏水性蛋白质组成,每个蛋白质分子含有多个通常呈对称排列的

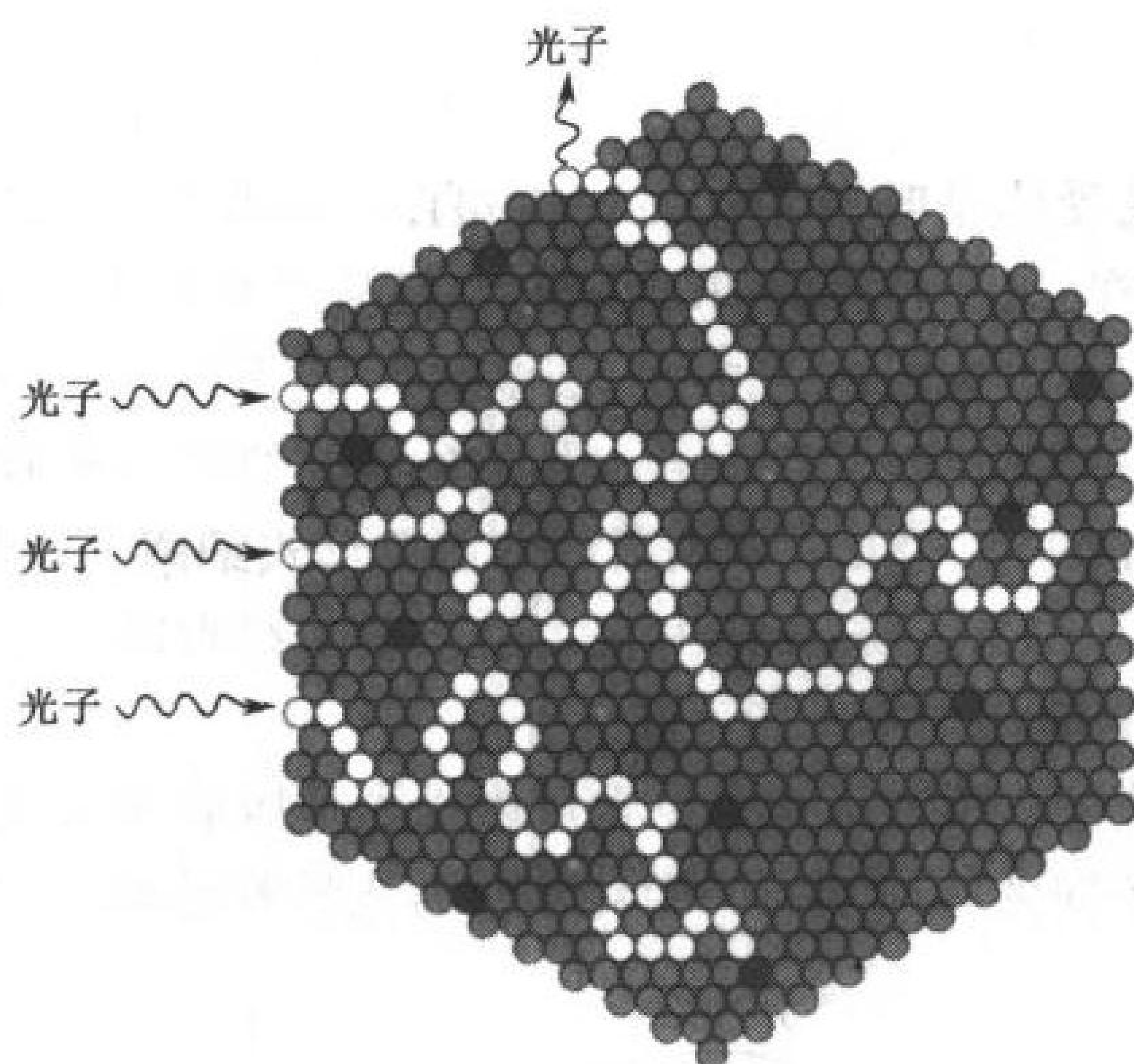
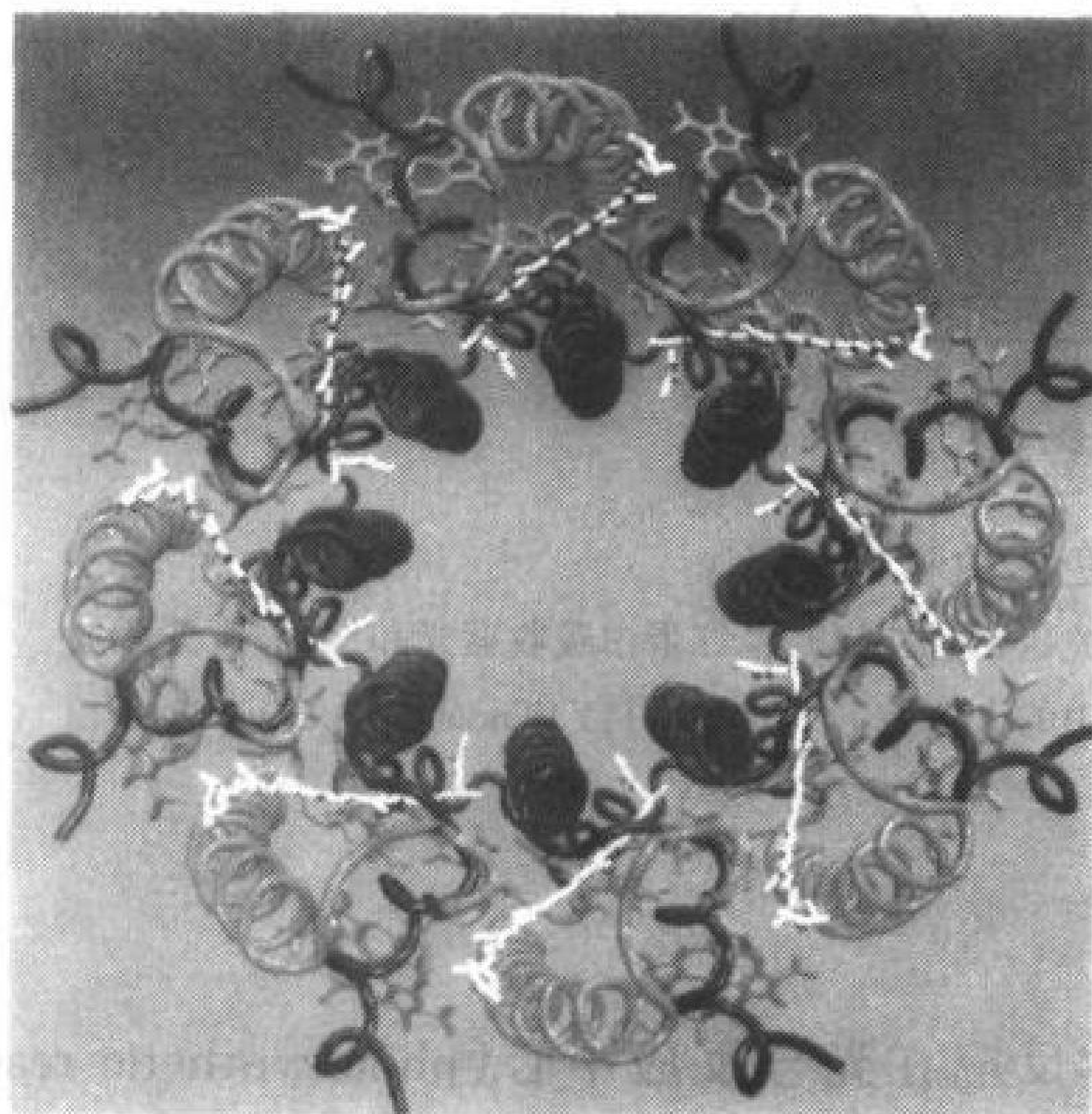


图 18-4 通过光合作用天线复合物的能量流动

被吸收的光子的能量在天线复合物(淡绿色环)中间随机迁移,直至到达反应中心叶绿素分子(深绿色环),或者被再次发射(荧光),而这种情况比较少见。


(a)

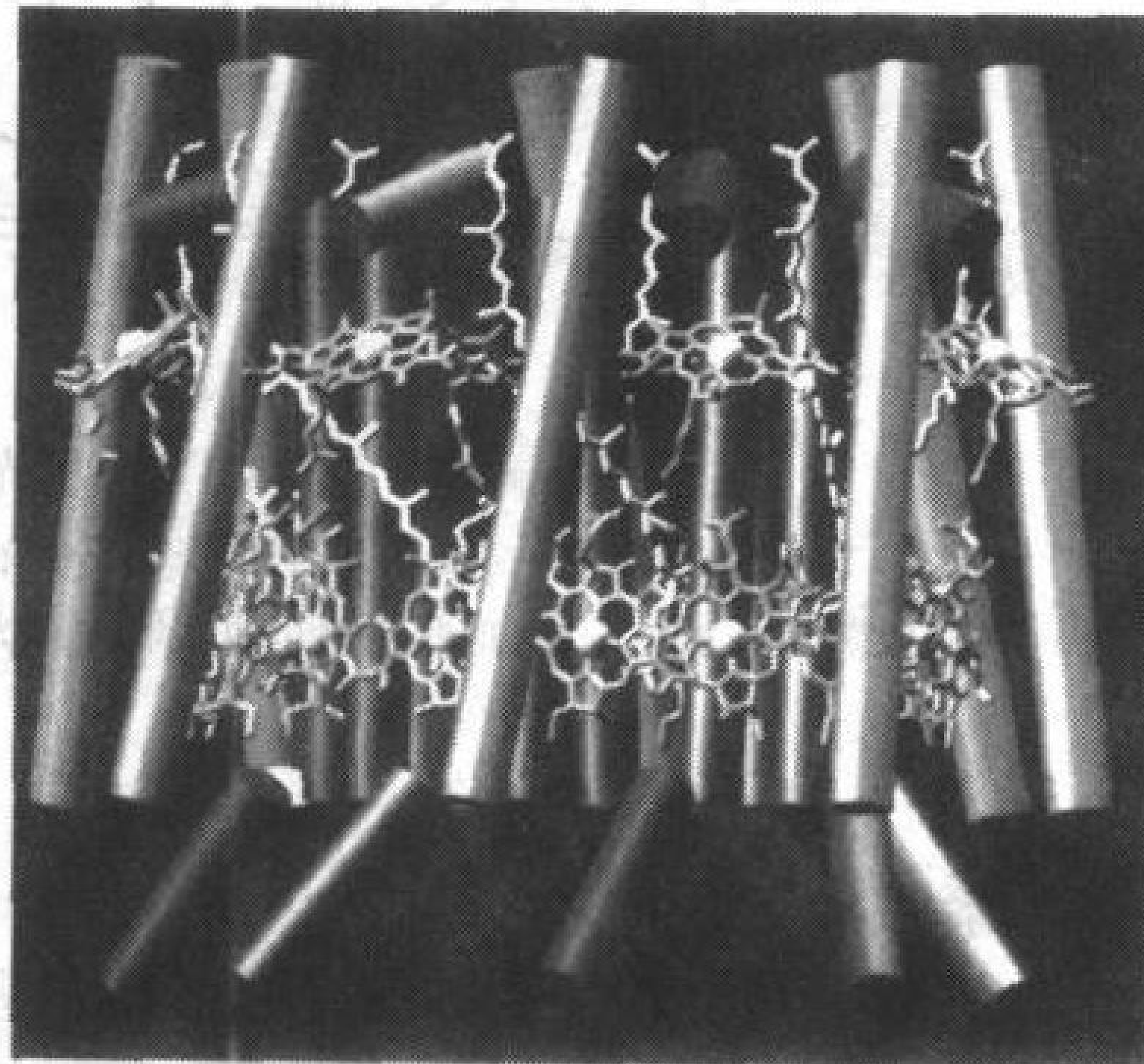
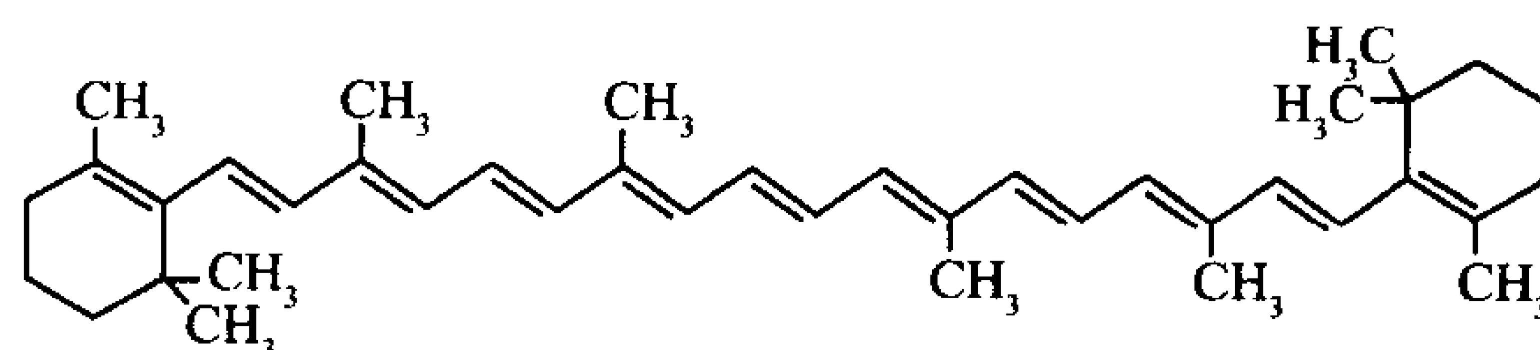

(b)

图 18-5 来自 *Rps. molischianum* 的集光复合物 LH-2 的 X 射线结构

(a)从垂直方向看光合作用的膜,可以看到 α 亚基(蓝色;56 个残基)和 β 亚基(洋红;45 个残基),用 C_α 骨架表示,排列成两个同心的 8 重对称环。32 个细菌叶绿素 a(BChl a;绿色)和 8 个蕃茄红素(一种类胡萝卜素;黄色)分子夹在蛋白质环之间。(b)从膜平面看,用和 a 中相同的颜色表示,蛋白质的 α 螺旋部分用圆柱体表示,Mg^{2+} 离子用白色球体表示。注意 8 个 BChl a 分子结合在复合物的顶部附近,其环系统几乎与膜平面平行,其余的 16 个 BChl a 分子结合在复合物的底部附近,其环系统与膜平面接近垂直。这种排列,以及蕃茄红素的排列,可能优化了天线系统吸收光能和激发-发射的能力。(引自 Juergen Koepke and Hartmut Michel, Max-Planck Institut für Biochemie, Germany)

色素分子。例如，来源于紫色光合细菌 *Rhodospirillum molischianum* 的 LH-2 是一个集成性的膜蛋白，由 8 个 α 亚基和 8 个 β 亚基排列成两个 8 重对称的同心环，环与环之间夹着 32 个色素分子(图 18-5)。其他的 LHC 在结构以及集光色素的数量方面变化较大，每个 LHC 所含色素分子的数量和排布可能经过优化，以便能量传递有效地贯穿 LHC。

除了叶绿素外，大多数 LHC 还含有其他光吸收物质。这些**辅助色素**(accessary pigment)“填补”了天线复合物的吸收光谱，覆盖了那些叶绿素不能强吸收的光谱区(图 18-3)。例如，**类胡萝卜素**(carotenoid)，它们是线性的多烯化合物，如 **β-胡萝卜素**(β-carotene)，

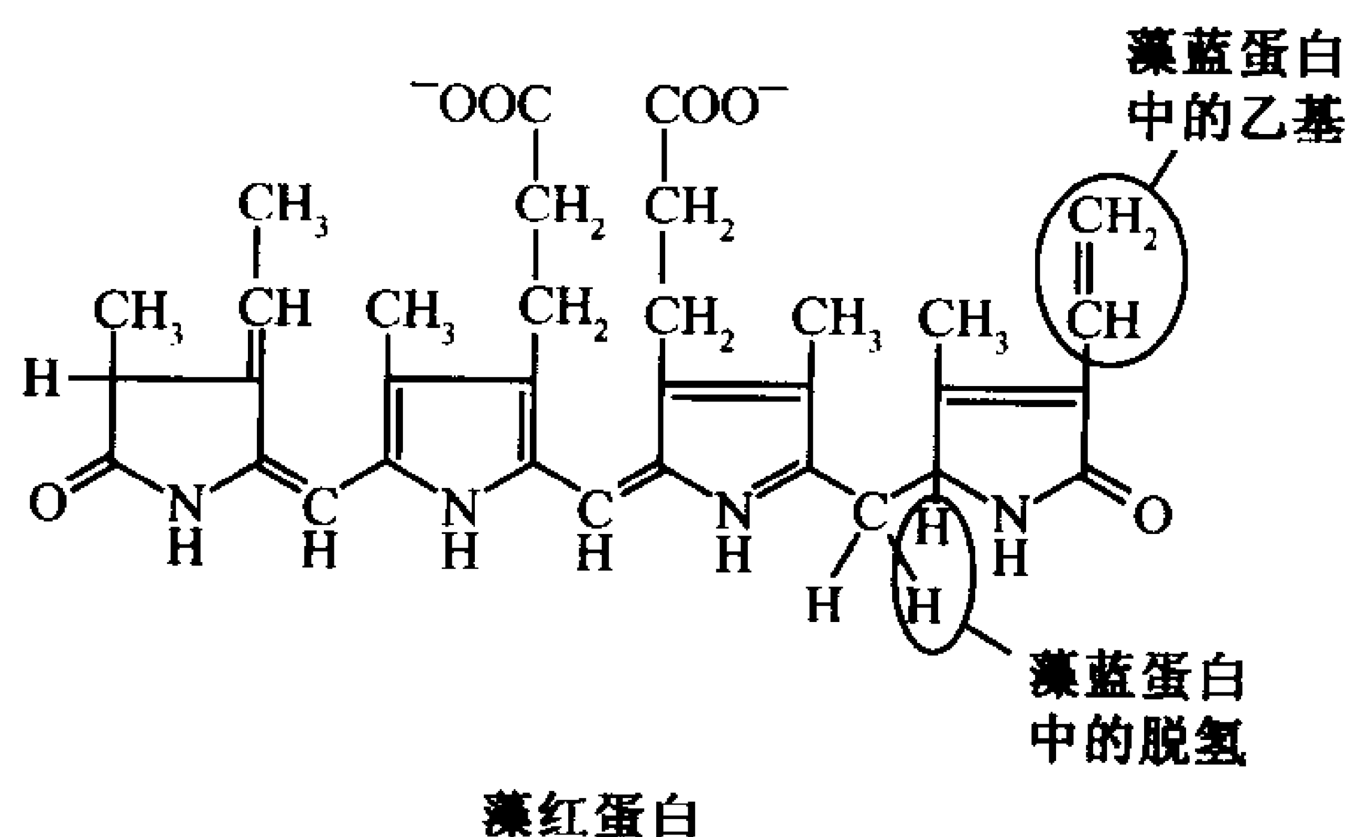


β-胡萝卜素

是所有绿色植物和许多光合细菌的组分，因此是最常见的辅助色素(它们是造成胡萝卜橙色的主要原因，胡萝卜也因此得名，同时也是落叶树明亮秋色的主要原因)。

535

地球上几乎一半的光合作用是由水生光合有机体承担的，它们还含有其他种类的辅助色素。因为波长在 450～550nm 以外的光(蓝光和绿光)穿过 10m 以上水深时几乎完全被吸收。因此在红藻和蓝绿藻中，作为天线色素的 Chl a 被一系列线性四吡咯分子取代，即红色的**藻红蛋白**(phycoerythrin)和蓝色的**藻蓝蛋白**(phycocyanin)(其吸收光谱见图 18-3)。



藻红蛋白

2．光反应

在光合作用过程中，来自被激发的叶绿素分子的电子通过一系列的受体传递，将电能转化为化学能。因此我们可以提出两个问题：①能量传递的机制是什么？②被光氧化的叶绿素分子如何重新获得失去的电子？

A．光和物质的相互作用

电磁辐射以不连续的**量子**(quanta)(光子)形式传播，其能量 E 可由**普朗克定律**(Planck′s law)计算：

$$E = h\nu = hc/\lambda$$

其中 h 是**普朗克常数**(6.626×10^{-34}J·s)，c 是光速(在真空中为 2.998×10^{8}m·s^{-1})，ν 是辐射频率，λ 是波长。

当一个分子吸收一个光子后，它的一个电子就从基态(能量最低)分子轨道提升到一个高能

轨道。但是，某个给定的分子只能吸收特定波长的光子，因为根据能量守恒定律的要求，两种状态之间的能量差必须与吸收的光子的能量精确地匹配。

536

电子激发态分子可以以几种方式释放其激发能(图 18-6)。

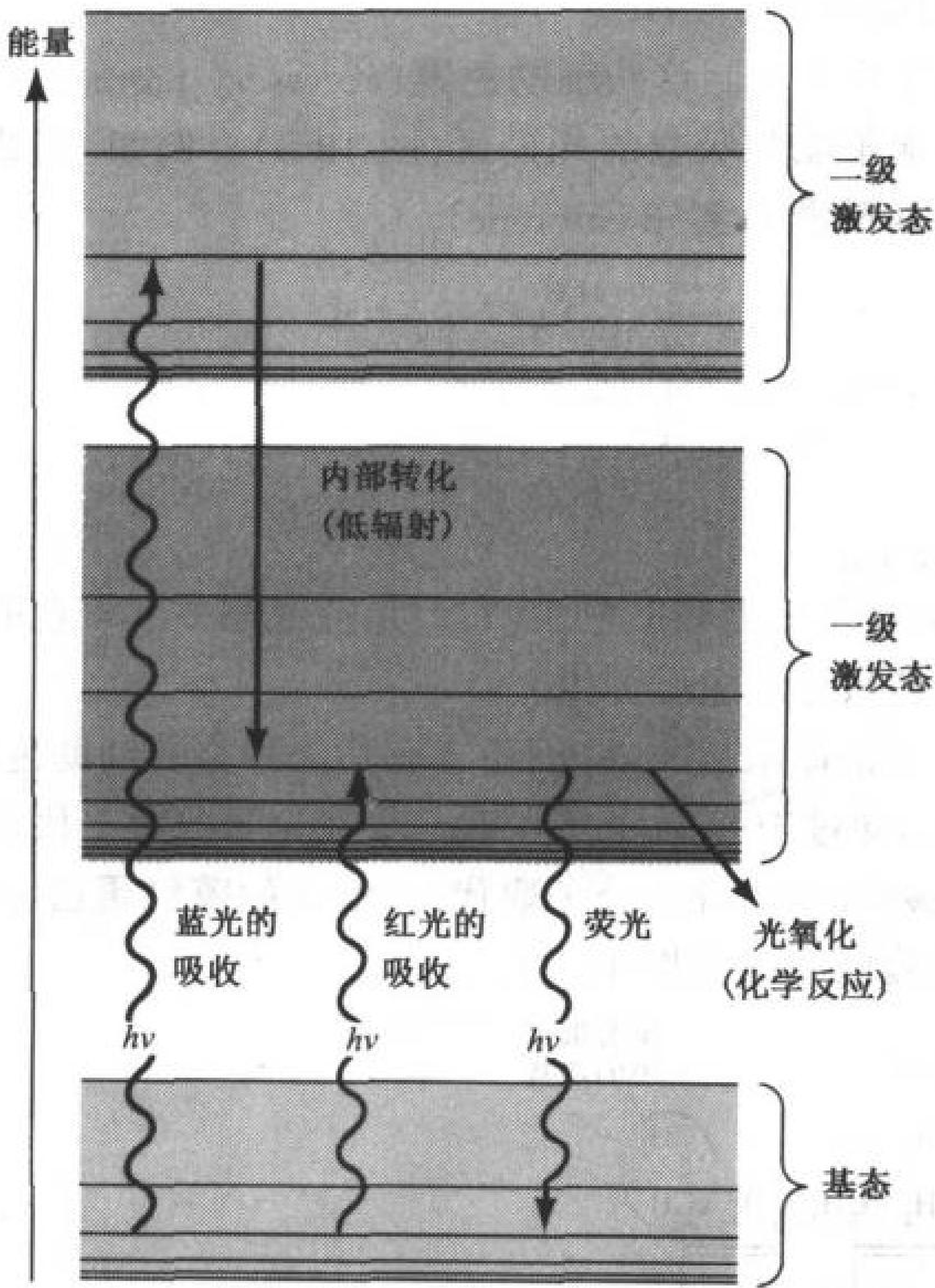


图 18-6 叶绿素及其最重要的中间转化形式的电子状态的能量示意图

波浪形箭头代表光子的吸收或其荧光发射。激发能也可以通过辐射较少的过程释放，如内部转化(热的产生)和化学反应。

1) **内部转化**(internal conversion)，这是一种常见的衰变形式，电能被转化为分子运动的动能，也就是热能。许多分子以这种方式释放能量回到基态。但是叶绿素分子通常只回到其最低激发态。因此，吸收了短波段的光子的叶绿素分子相应于它的二级激发态，所具有的可用于光合作用的激发能，与吸收了能量较低的长波段的光子的叶绿素分子所具有的激发能并无差别。

2) **荧光**(fluorescence)，电子激发态分子通过发射光子衰变回到它的基态，以荧光发射的光子一般比开始时吸收的光子波长长(能量较低)。荧光只消耗了生长中的植物所吸收的光能的 3%～6%。

3) **激发子转移**(exciton transfer)[也称为**共振能量转移**(resonance energy transfer)]，被激活的分子直接将其激发能转移给邻近的具有相似的电子性质的非激发分子。这个过程通过参与分子的分子轨道之间的相互

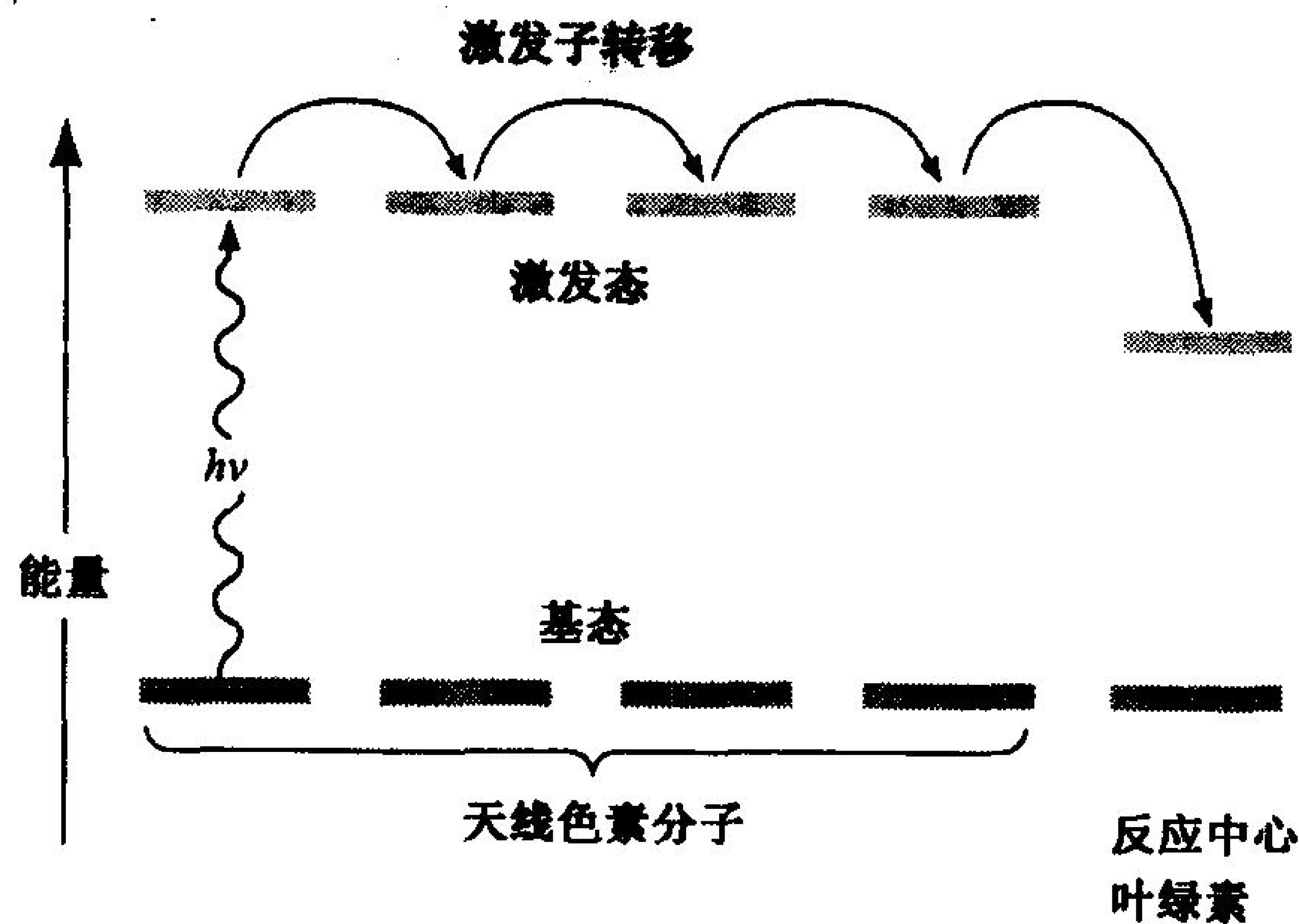


图 18-7 被光合反应中心捕获的激发能

光能通过激发子转移在色素分子中传递并被反应中心的叶绿素分子捕获，因为其最低激发态具有的能量比天线色素分子低。

作用而进行。光能通过天线色素之间的激发子转移而汇集到光合反应中心。能量(激发能)被捕获到反应中心叶绿素中,因为它们的激发态能量略低于天线叶绿素(图 18-7)。　537

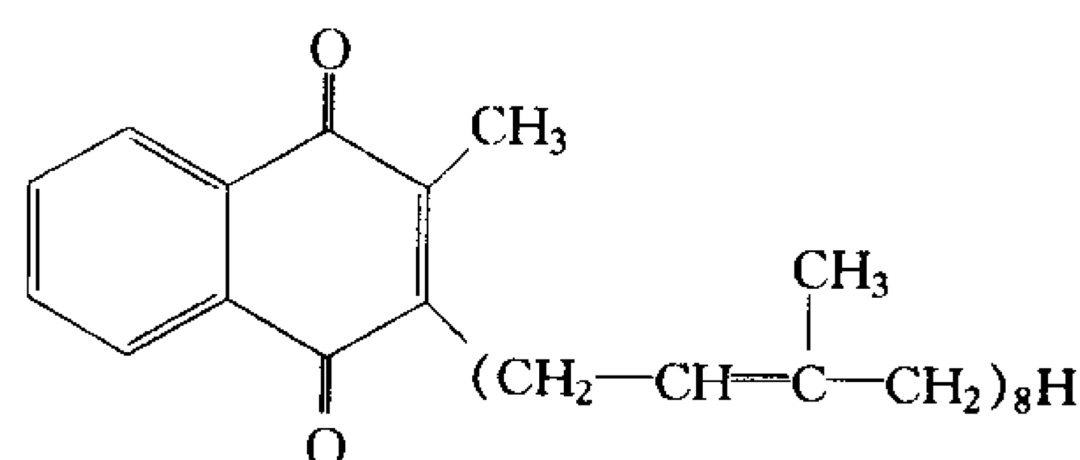
4) **光氧化作用**(photooxidation),被光激活的供体分子将电子传递给受体分子而被氧化,后者则被还原。这个过程之所以发生,是因为被传递的电子与其供体的结合在激发态时比基态时更松散。光合作用中,被激活的叶绿素(Chl^*)就是这种供体。被吸收的光子的能量从而通过化学机制转移给光合反应系统,被光氧化的叶绿素,Chl^+,一种阳离子自由基,通过氧化其他分子最终回到其基态。

B. 光合细菌中的电子传递

在紫色光合细菌中,与膜结合的细菌叶绿素复合物在红光照射下进行光氧化作用。激发的电子沿一系列载体传递,直至回到起始的细菌叶绿素复合物中。在电子传递过程中,胞质内的质子被转位跨过细胞质膜。产生的质子梯度驱动 ATP 的合成。紫色细菌中相对较简单的光合反应中心可用以阐明在更复杂的植物和蓝绿藻(见节 18-2C)光合机器中进行的光化学反应的基本原理。

光合反应中心是一个跨膜蛋白

几种紫色光合细菌的光合反应中心均含有被称为 H、L 和 M 的 3 种疏水性亚基。L 和 M 亚基共结合 4 分子细菌叶绿素、2 分子**细菌褐藻素**(bacteriophaeophytin, BPheo, 一种细菌叶绿素,其中的 Mg^{2+} 被 2 个质子取代),一个 Fe(II)离子和 2 分子氧化还原辅酶泛醌(图 17-10b)或 1 分子泛醌和 1 分子相关的**甲基萘醌**(menaquinone)(右图)。　538



甲基萘醌

红假单孢菌[*Rhodopseudomonas* (*Rps.*) *viridis*]的光合反应中心是第一个在原子细节上被描述的跨膜蛋白质(图 10-5)。它的 11 个跨膜螺旋的排列与 *Rhodobacter* (*Rb.*) *sphaeroides* 的反应中心(图 18-8)十分相似,尽管 *Rb. sphaeroides* 蛋白没有 *Rps. viridis* 蛋白的 *c* 型细胞色素。

Rps. viridis 蛋白的辅基的排布见图 18-9。这种反应中心最有意思的一点是,这些辅基排列成几乎完美的二重对称。称为**特异配对**(special pair)的 2 个 BChl 分子紧密结合,彼此几乎平行,Mg 与 Mg 之间的距离约 7Å。这种特异配对通常以其最大吸收波长(以 nm 表示)命名[例如 **P870**;光合细菌一般生长在阴暗污浊的池塘中,可见光(400～800nm)不能穿透;它们需要可以吸收红外区附近波长的叶绿素]。特异配对中的每个成员与另一分子 BChl 结合,后者又与一个 BPheo 分子结合。甲基萘醌靠近 L 亚基的 BPheo(图 18-9,右),泛醌与 M 亚基 BPheo a(图 18-9,左)结合。Fe(II)位于甲基萘醌和泛醌环之间。奇怪的是,辅基的这二套对称相关的部分在功能上并不相当,电子几乎完全通过 L 亚基传递(图 18-8 和图 18-9 的右边部分)。这种效应通常是由 L 和 M 亚基之间细微的结构差异造成的。

吸收光子快速光氧化特异配对

由光合反应中心介导的光化学反应按以下步骤进行:　539

1) 细菌光合作用的基本的光化学反应是由特异配对(如 P870)吸收光子。被激发的电子和 2 个 BChl 分子分离。

2) P870*,激发态 P870 存在时间很短,在约 3ps(皮秒,$1ps = 10^{-12}s$)内 P870* 将电子传递给

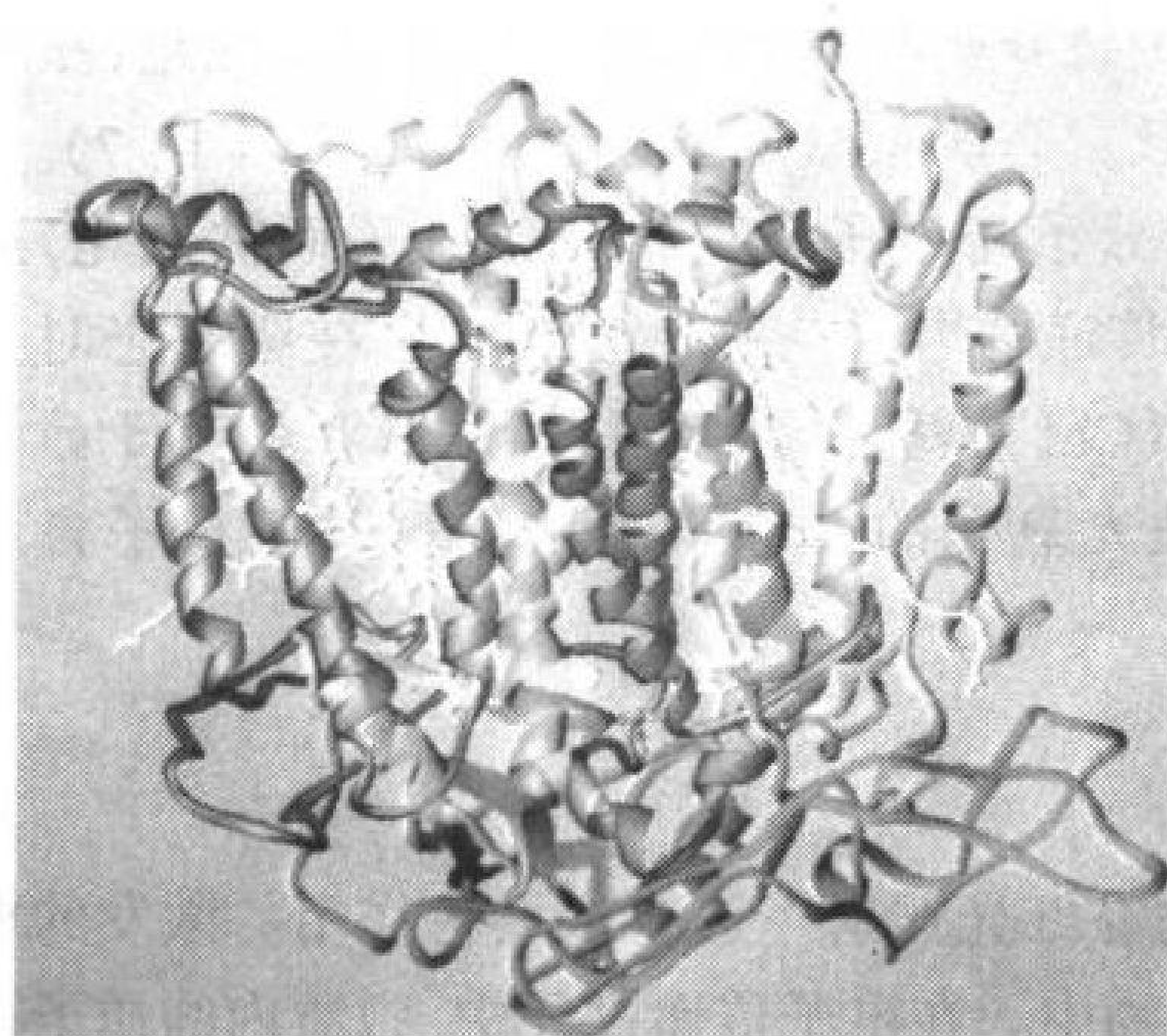


图 18-8 *Rb. sphaeroides* 的光合反应中心的带状结构示意图

这是从质膜平面内(细胞膜下面)观察这个蛋白质,其 H、M 和 L 亚基分别用洋红、蓝绿色和橙色表示,辅基为黄色,以骨架形式表示。Fe(II)原子用球形表示。构成蛋白质中心部分的 11 个大致垂直的螺旋组成其跨膜区。将这一结构与 *Rps. viridis*(图 10-5)的光反应中心的结构相比较,后者的 H、M 和 L 亚基与 *Rb. sphaeroides* 的亚基分别有 39%、50% 和 59% 相同。注意 *Rb. sphaeroides* 蛋白在其胞质面缺少 *c* 型细胞色素(图10-5中用绿色表示)。

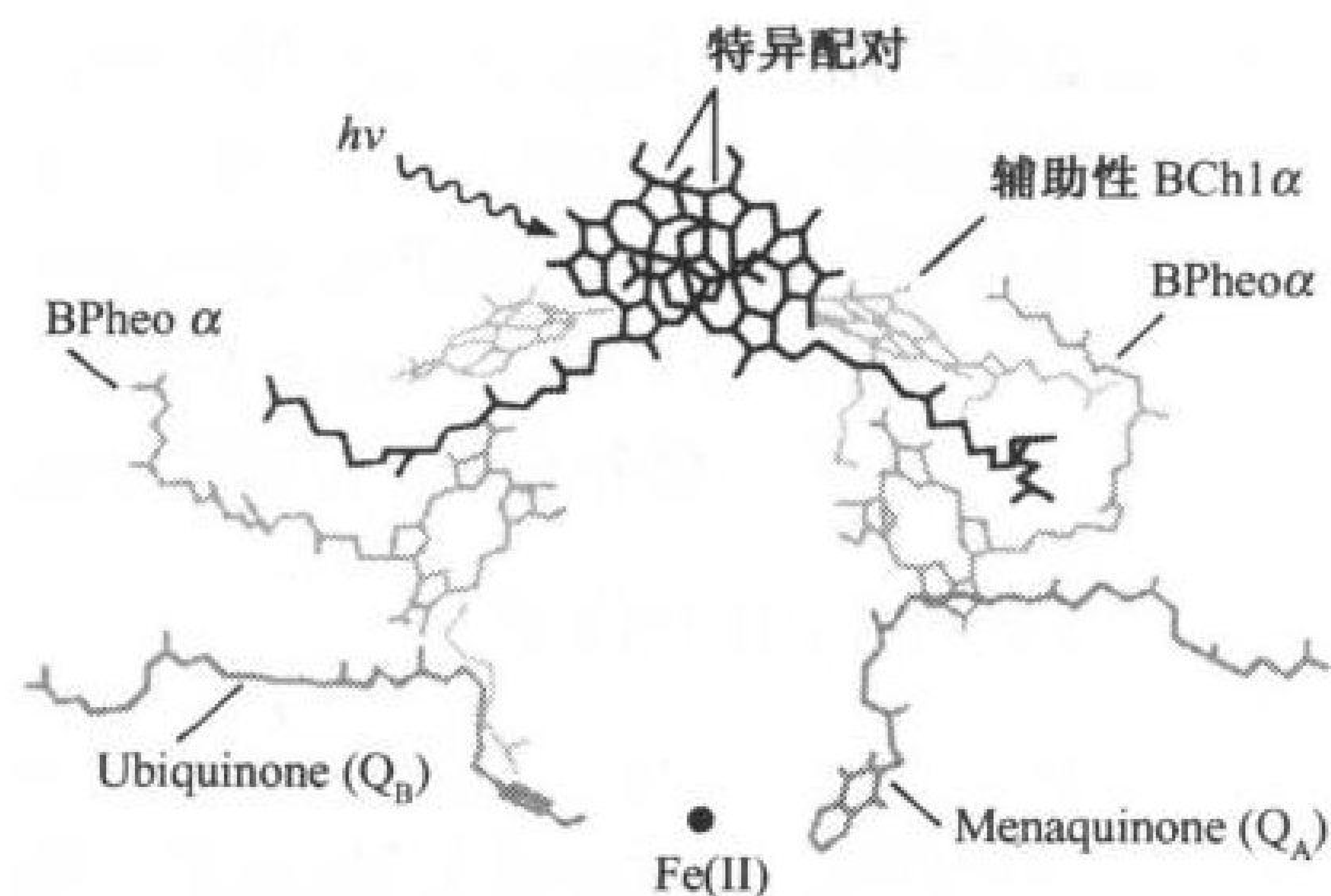


图 18-9 *Rps. viridis* 的光合反应中心的辅基排布

注意,它们的环,而不是其脂肪侧链,接近二重对称。光子由 BChl a 分子(红色)的特异配对吸收。

图 18-9 中右边的 BPheo,产生 $P870^+$ BPheo a^-(中间插入的 BChl 基团虽然本身不被还原,但可能在传递电子时起作用,因此被称为**辅助 BChl**(accessory BChl)。

3) 在接下来的 200ps 中,电子迁移到称为 Q_A 的甲基萘醌(或者,在许多种属中是第二分子泛醌)中,形成阴离子半醌 Q_A^-。

激发态电子从邻近的 $P870^+$ 被快速移去是光合反应中心的一个重要特征;它阻止了电子重新回到 $P870^+$,否则激发能会内部转化为热能,造成浪费。事实上,反应中心的电子传递非常有效,总的**量子产率**(quantum yield)(反应分子和吸收光子比)本质上达到 100%。没有任何人造的装置的效率可以达到这种水平。

电子通过电子传递链回到光氧化的特异配对

Q_A^- 位于光合反应中心的一个疏水性口袋中,它的激发态电子传递给更暴露于溶剂的泛醌 Q_B,形成 Q_B^-[位于 Q_A 和 Q_B 之间的 Fe(II)离子不直接参与这些氧化还原反应]。Q_A 从不被完全还原,而是在其氧化态和半醌形式之间穿梭。

当反应中心再一次被激发时,它将第二个电子传给 Q_B^-,形成完全被还原的 Q_B^{2-}。这个阴离子氢醌从细胞膜的细胞质一侧摄取 2 个质子后形成 Q_BH_2。因此,*Q_B 是一个分子转导器,它将两个由光驱动的单电子激发转化为一个双电子化学还原。*

Q_BH_2 摄取的电子通过电子传递链最终回到 $P870^+$ 中(图 18-10)。这个过程的细节是高度种属依赖性的。已知的氧化载体包括一个与膜结合的泛醌分子库、一个**细胞色素 *bc_1* 复合物**(cytochrome

bc_1 complex)和**细胞色素 c_2**(cytochrome c_2)。电子传递的途径是从 Q_BH_2,经过 Q_BH_2 与泛醌库的交换,传到细胞色素 bc_1,然后再到细胞色素 c_2。被还原的细胞色素 c_2 与线粒体细胞色素 c 十分相似,将一个电子传回给 $P870^+$,反应中心因而被还原,并准备吸收另一个光子。

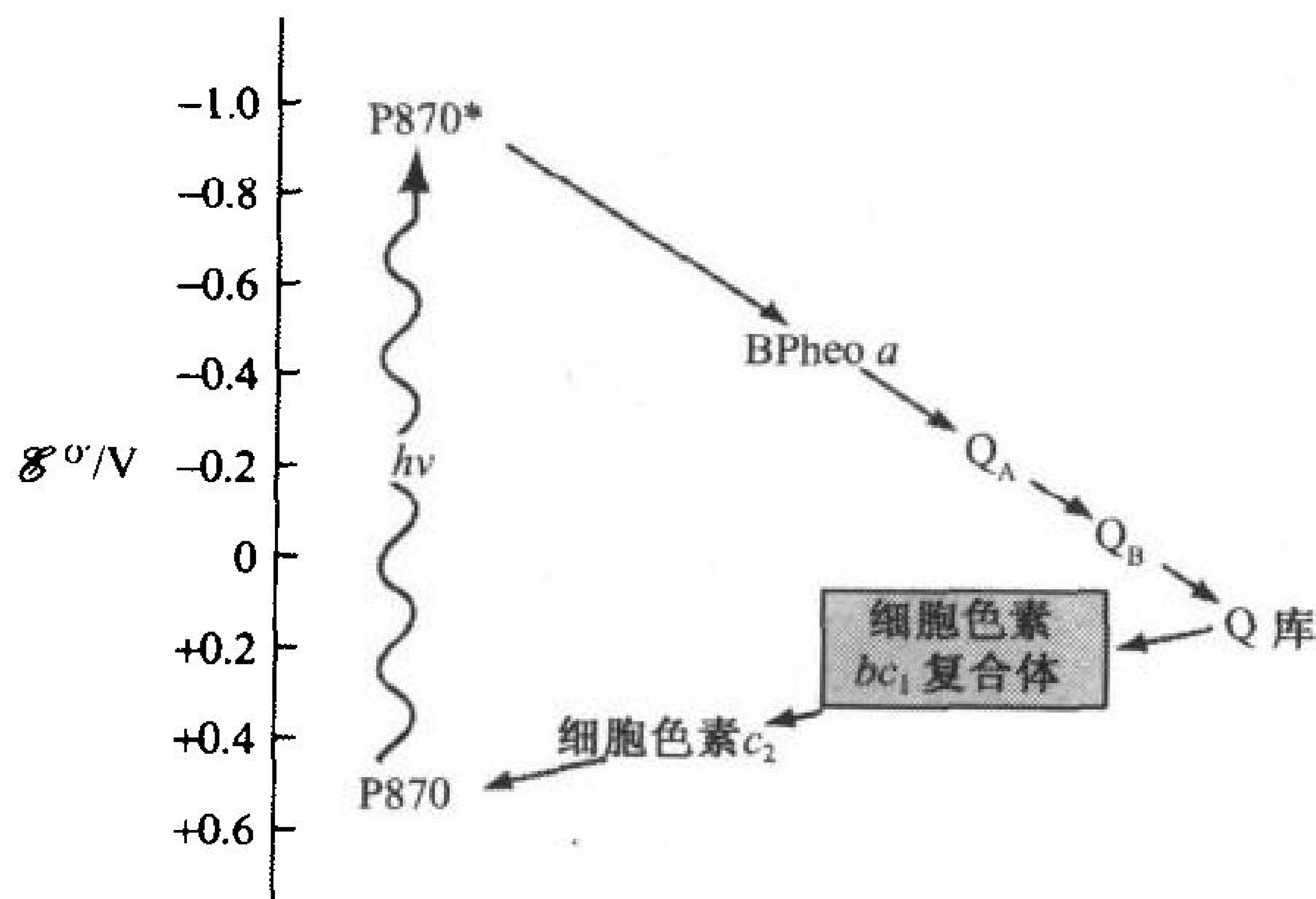


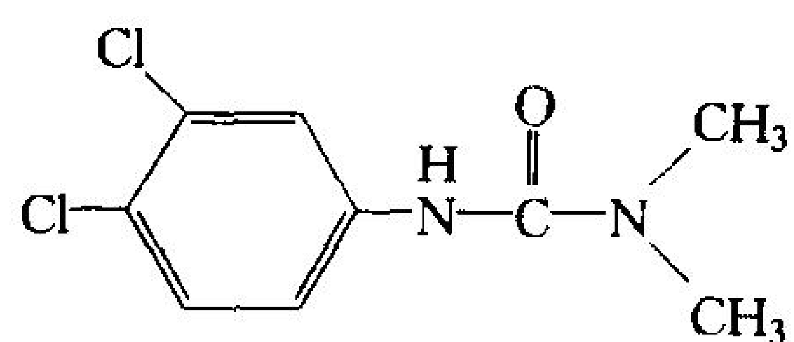
图 18-10　紫色光合细菌的光合电子传递系统

P870 吸收光子而释放出的电子在到达 Q_B 之前,通过 BPheo a 和 Q_A、Q_B,再与游离的泛醌库交换。电子从 QH_2 通过细胞色素 bc_1 传给细胞色素 c_2,然后还原 $P870^+$。注意 Q 的双电子还原为 QH_2 需要两个光子,而细胞色素 c_2 一次只能将一个光子返回光合反应中心。由于电子是被逐步转移到低能态(标准还原电势的值更正),因此整个过程是不可逆的。

由于紫色光合细菌中的电子传递是一个循环过程(图 18-10),因此净结果并无氧化还原反应。但是,当 QH_2 将其电子传给细胞色素 bc_1 时,其质子转位跨过细胞膜。细胞色素 bc_1 是一个跨膜蛋白复合物,含有一分子[2Fe-2S]铁-硫蛋白、一分子细胞色素 c_1,以及一分子含 2 个血红素 bH 和 bL(H 和 L 分别表示高、低电位)的细胞色素 b。注意细胞色素 bc_1 与线粒体的质子转位复合物 III(也称作细胞色素 bc_1;见节 17-2E)十分相似。事实上,电子从 QH_2(一个双电子载体)传递给单电子受体细胞色素 c_2,是在两步 Q 循环中进行的,与发生在线粒体中的电子传递(图 17-13)完全一样。净效应是每 2 个电子从 QH_2 传递给细胞色素 c_2,就有 4 个质子进入周质空间。因此,光合反应中心吸收光子,产生了跨膜 H^+ 梯度。这个梯度的消减驱动了依赖于光的 ATP 合成,这个过程被称为**光合磷酸化**(photophosphorylation)(见节 18-2D)。　540

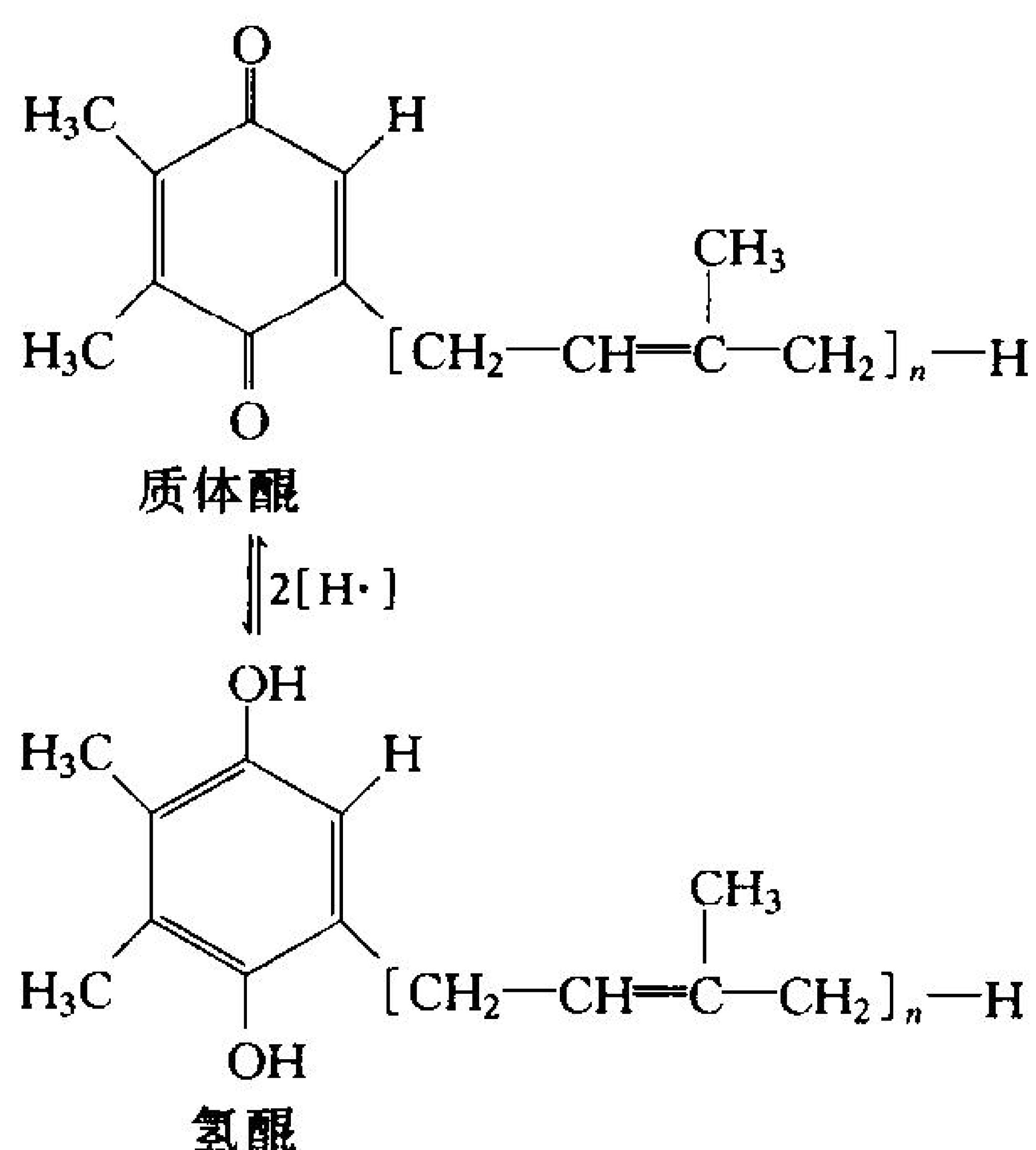
C. 双中心电子传递

在植物和蓝绿藻中,光合作用是一个非循环过程,它利用光驱动的 H_2O 的氧化,产生还原能,合成 NADPH。这一多步骤过程涉及二个反应中心,每一个都与细菌光合中心有相似之处。绿色植物的反应中心是**光系统 I**(photosystem I, PSI),可以还原 $NADP^+$,和**光系统 II**(photosystem II, PSII),可以氧化 H_2O。每个光系统独立地被光活化,但电子从 PSII 流向 PSI,因而 PSI 和 PSII 依次耦合 H_2O 的氧化与 $NADP^+$ 的还原。存在二个光系统的证据来自这样的观察结果:在既有红光(只活化 PSI)又有黄绿光(也活化 PSII)存在时,植物产生 O_2(亦即氧化 H_2O)的速度高



3-(3,4-二氯苯基)-1,1-二甲基尿素(DCMU)

于每种光单独作用时的速度之和。除草剂 **3-(3, 4-二氯苯基)-1, 1-二甲基尿素**(3, 4-dichlorophenyl)-1, 1-dimethylurea(DCMU)阻断电子从 PSII 流向 PSI, 因此即使有足够的光照(也就是说既可以活化 PSI 也可以活化 PSII), 也没有电子供给 PSI。PSII 不能被再氧化, 光合作用的氧生成也就终止了。



对叶绿体中的电子传递途径比光合细菌中的传递途径了解得更为清楚。从 H_2O 到 $NADP^+$ 的电子传递所涉及的组分大体上组合为 3 种与类囊体膜结合的颗粒(图 18-11): PS II、**细胞色素 b_6f 复合物**(cytochrome b_6f complex)和 PS I。电子在这些复合物之间通过可移动的电子载体传递, 与呼吸链电子传递很相似。泛醌类似物**质体醌**(plastoquinone, Q)还原产生**氢醌**(plastoquinol, QH_2)(左图), 将 PSII 与细胞色素 b_6f 复合物联系起来, 细胞色素 b_6f 复合物又通过可移动的蛋白质**质体蓝素**(plastocyanin, PC)与 PSI 相互作用。电子最终到达**铁氧还蛋白-$NADP^+$ 还原酶**(ferredoxin- $NADP^+$ reductase), 用于还原 $NADP^+$。水的氧化以及通过 Q 循环的电子传递形成跨膜质子梯度, 类囊体腔内的[H^+]较高, 而基质中的[H^+]较低。这个质子梯度的自由能被 ATP 合成捕获(见节 18-2 D)。

541

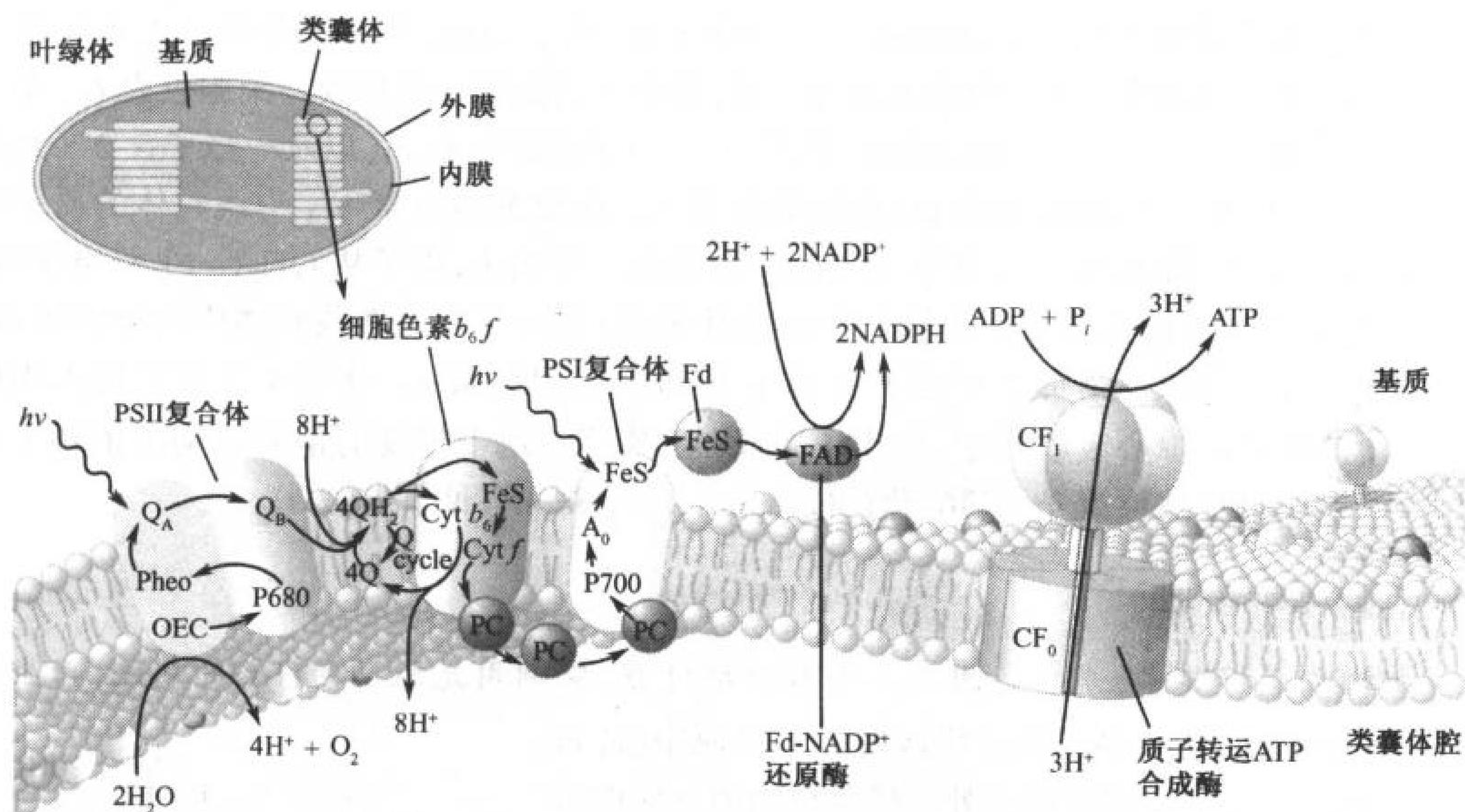


图 18-11 *功能的秘诀*: 类囊体膜的模型

电子传递系统由三个蛋白质复合物组成: PSII、细胞色素 b_6f 复合物和 PSI。这些复合物通过电子载体质体醌(Q)和质体蓝素(PC)的扩散"相连"。受光驱动的从 H_2O 到 $NADP^+$ 的电子传递(黑箭头)推动质子转运到类囊体腔内(红箭头)。额外的质子由产氧中心(OEC)从水中分离出来, 并释放氧。形成的质子梯度推动 CF_1CF_0 质子转位 ATP 合酶合成 ATP。膜上还含有集光复合物(未表示), 其色素组分将激发能转移给 PSI 和 PSII。Fd 代表铁氧还蛋白。[引自 Ort, D.R. and Good, N.E., *Trends Biochem. Sci.* 13, 469(1988)]

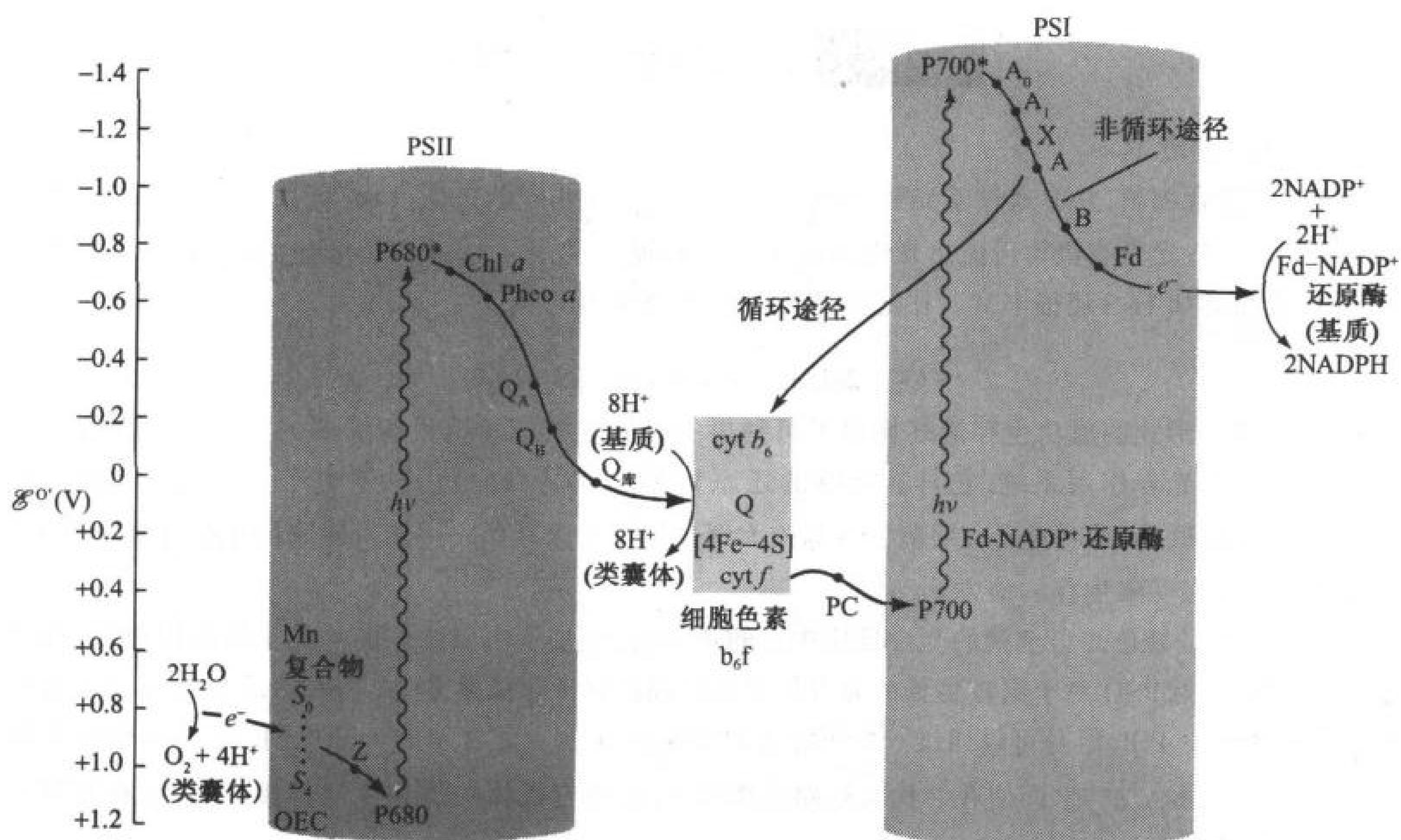


图 18-12　光合作用的 Z 构架

通过光子的吸收，从 PSII 的 P680 释放的电子被 Mn 复合物（产氧中心；OEC）从 H_2O 中抽取的电子所取代，从而产生 O_2 和 4 个 H^+。释放的电子通过一条电子载体链传递到质体醌分子（Q）库。产生的氢醌再去还原细胞色素 b_6f 颗粒（黄色框），同时质子转位到类囊体腔中。然后细胞色素 b_6f 再将电子转移给质体蓝素（PC）。质体蓝素使 PSI 中被光氧化的 P700 再生。在非循环式电子传递中，从 P700 释放的电子通过一条电子载体链的介导，将 $NADP^+$ 还原为 NADPH。或者，在循环式过程中，电子可能再回到细胞色素 b_6f 复合物。在此过程中，额外的质子转位到类囊体腔中。还原电势向下增加，因此电子自发向此方向流动。

植物的光合作用装置的各种辅基可以排列成一个称为 **Z 构架**（Z-scheme）的示意图（图 18-12）。如同其他电子传递系统，电子从低还原电位流向高还原电位。Z 构架的 Z 形特征反映了驱动电子从 H_2O 流向 $NADP^+$ 所需的两个光化学反应中心（一个在 PSI，一个在 PSII）。双中心光合过程的进化起源仍不清楚（见框 18-1）。

五步水裂解反应产生 O_2

PSII 的**产氧中心**（oxygen-evolving center, OEC）也被称为**水裂解酶**（water-splitting enzyme），因为它将 2 个水分子裂解为 1 分子 O_2[①]、4 个质子和 4 个电子。为洞察这一过程，Pierre Joliet 和 Bessel Kok 分析了将暗适应的叶绿体暴露在一系列短暂闪光下 O_2 的产生。O_2 是以一种特别的振荡形式产生的（图 18-13）。在开始的二次闪光下，几乎没有 O_2 的产生。第三次闪光产生的 O_2 达到最大值。以后，产氧量每 4 次闪光形成一个峰，直至这种振荡逐渐衰减回到恒态。这种周期性说明，每个 OEC 在释放 O_2 之前一定进行了 4 次依赖于光的反应。

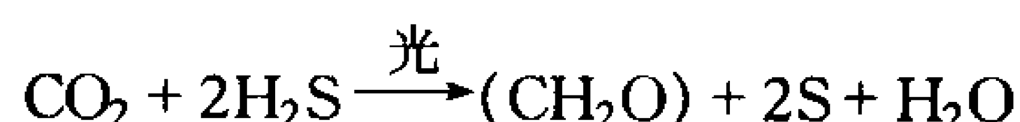
542

① 原文为 2。——译者注

框 18-1 生物化学相关内容

光合系统的进化

现代的光合细菌，并非通过受光驱动的 H_2O 的氧化产生相应的还原产物，被认为与最初的光合有机体相似。这些光合有机体可能出现在细胞生命史的极早期，那时候环境提供的高能化合物来源缩减，而还原物质如 H_2S 还很丰富。在这些光合细菌中，光合反应为：



$$CO_2 + 2H_2S \xrightarrow{\text{光}} (CH_2O) + 2S + H_2O$$

显然，这些生命形式的成功生存最终耗尽了可利用的还原性资源。现代蓝绿藻的祖先为适应这种环境，进化出一种光合作用系统，它具有足够的还原势能，可以从 H_2O 中抽取电子。产生的有毒废物——O_2 逐渐累积，从而迫使光合细菌——其中大部分为专性厌氧菌——转入狭窄的生态性小生境中，也就是它们现在受限生存的地方。

PSII 看来是紫色光合细菌的光合反应中心的衍生物，增加了产氧中心的功能。有证据表明，在进化历史的某阶段，PSII 对于真核生物的光合作用就已经足够了。藻类 *Chlamydomonas reinhardtii* 的某些突变菌株缺少 PSI，但是可以通过一种可能需要细胞色素 b_6f 复合物的未知机制，将 H_2O 衍生的电子从 PSII 流向 $NADP^+$。即使在 Z 构架短路的情况下，这些有机体功能和生长都接近正常（在光照下是野生型细胞速度的 60%～70%）。

PSI 的起源疑点较多，看来它与 PSII 或紫色光合细菌的光合反应中心在遗传上并不相关，但是与第二类光合细菌——绿硫菌相关。PSI 参与从 H_2O 到 $NADP^+$ 的电子转移一定赋予了某些选择优势——也许是对光反应的精细调控——尽管两个光系统的组合在电子转移时需要的光子数实际上是单反应中心的二倍。

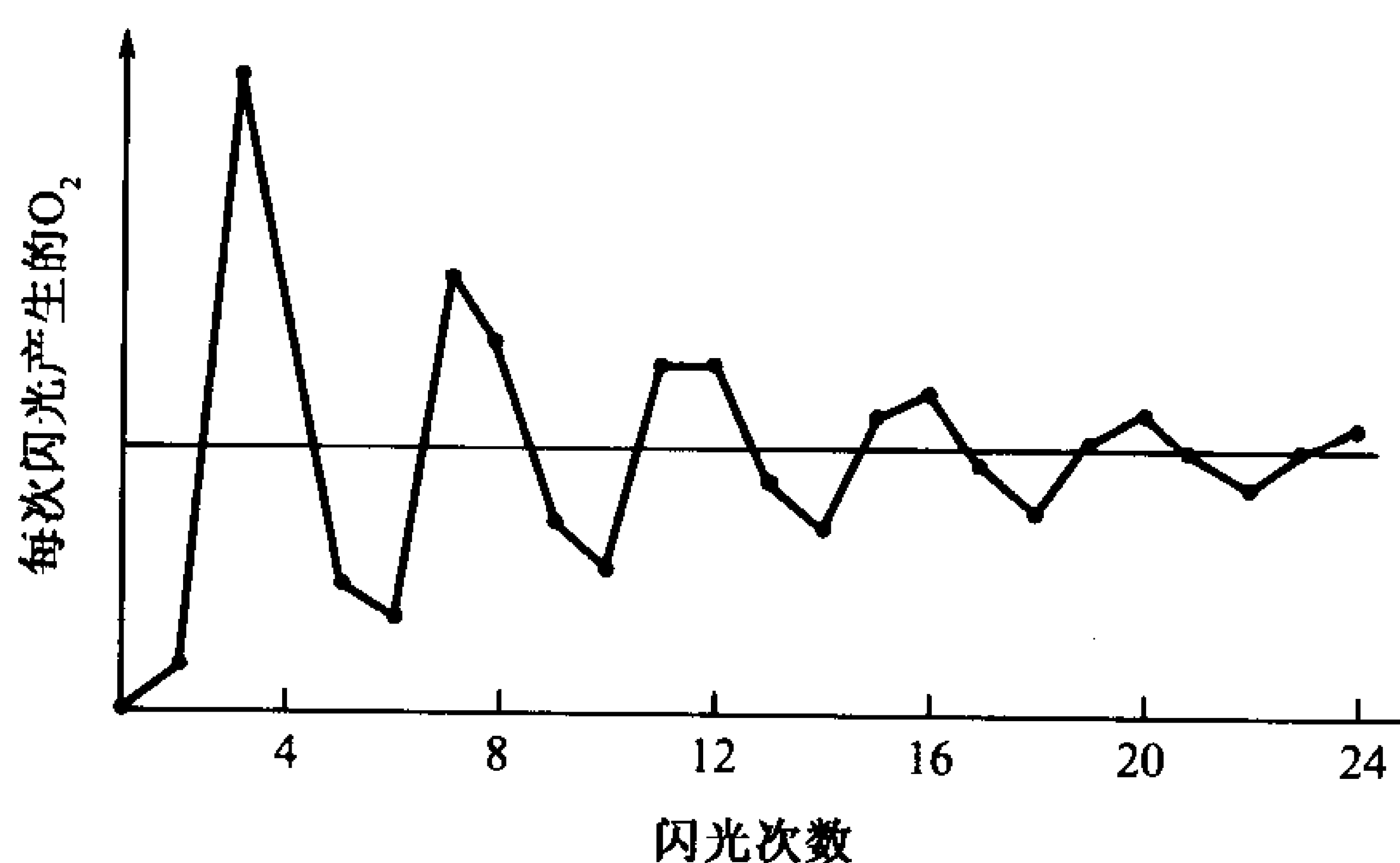


图 18-13 暗适应的菠菜叶绿体每次闪光产生的 O_2

注意：第 3 次闪光达到峰值，以后每第 4 次闪光达到峰值，直至曲线逐渐衰减到其平均值。［引自 Forbush, B., Kok, B., and McGloin, M. P., Photochem. Photobid. 14, 309(1971)］

543

OEC 被认为通过 5 个不同的状态：S_0 到 S_4 进行循环（图 18-14）。S_4 向 S_0 过渡时释放出 O_2。在第 3 次闪光而不是第 4 次闪光时 O_2 的产生达到峰值，这一现象表明 OEC 的静止态主要是在 S_1 而不是 S_0。振荡逐渐衰减是因为一小部分反应中心不能被再次激发，或被某一次闪光双重激发，从而使反应中心最终失去同步性。整个反应顺序总共有 4 个衍生于水的质子分步释放到类囊体内部。

由于 OEC 吸收了来自 H_2O 的电子，其 5 种状态一定具有特别高的还原电位（回忆表 13-3 中

O_2/H_2O 半反应的标准还原电位是 0.815V)。PSII 也必须在一段时间里(长达几分钟)稳定住紧靠水分子的高反应性中间产物。对此我们还才开始了解。OEC 除了含有 2 到 3 个 Ca^{2+} 和 4 到 5 个 Cl^- 以外,还含有 4 个与蛋白质结合的 Mn 离子。这些 Mn 离子的排列方式尚不清楚,显然通过 Mn(III)与 Mn(IV)氧化态进行循环,从 H_2O 中抽取质子和电子水裂解反应由 PSII 反应中心的激发驱动。

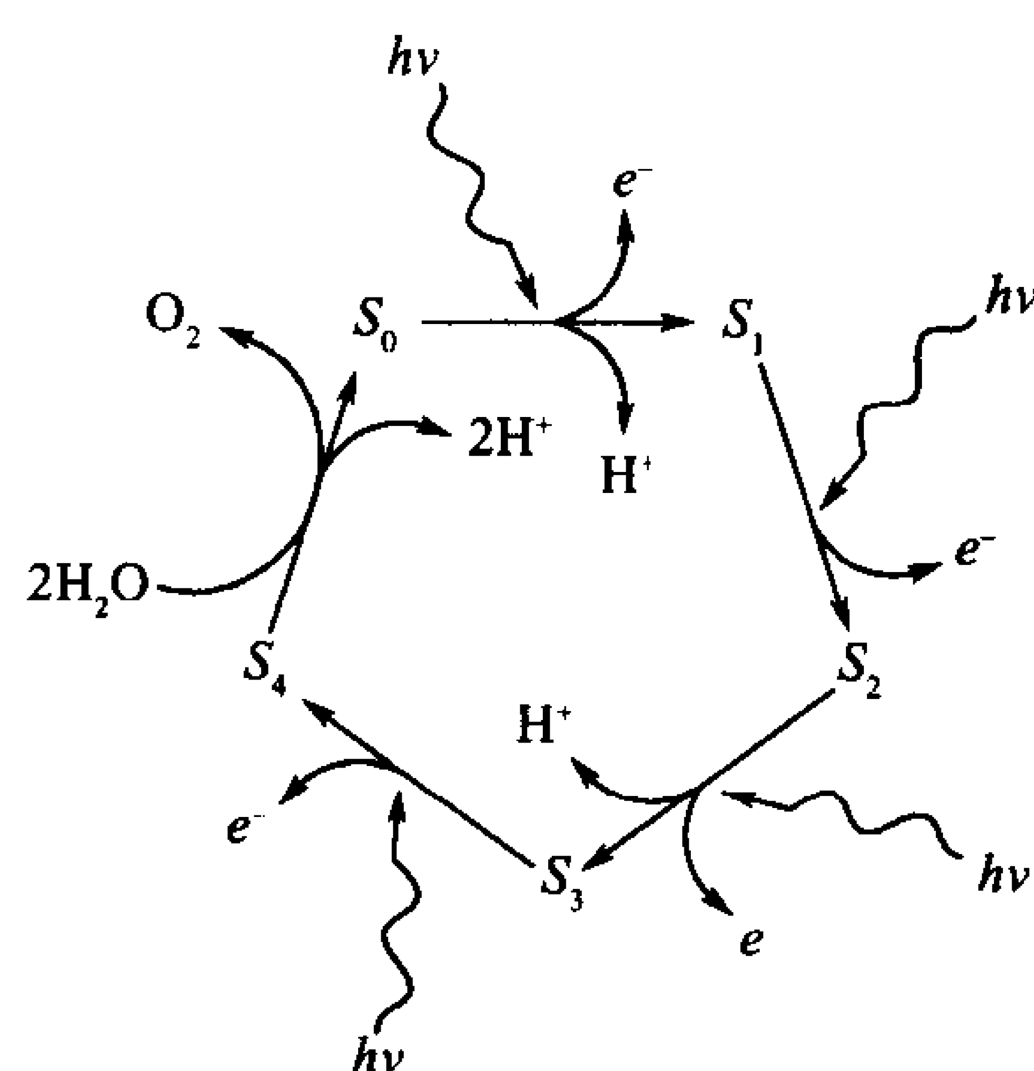


图 18-14　叶绿体中产生 O_2 的示意机制　在光驱动的反应中($S_0 \to S_4$),从 2 分子结合水中总共夺取了 4 个电子,每次夺得一个。在不依赖于光的恢复步骤($S_4 \to S_0$)中,释放出 O_2 并再结合 2 分子 H_2O。在这 5 步反应中有 3 步释放质子到类囊体腔内。

PSII 反应中心将电子传递给质体醌

PSII 的质子吸收中心由 Chl a(可能是一个特异配对)组成,根据其最大吸收波长命名为 **P680**。由光激发生成的 $P680^+$ 是已知的最强的生物氧化剂之一。它通过 OEC 的 4 种 S 状态从 H_2O 中抽取电子。一个被称为 Z 的酪氨酸根中继电子从 Mn 复合物到反应中心。

在 P680 还原侧(图 18-12 的右边)的电子载体链与细菌光合反应中心的电子载体链(见节 18-2B)相似。实际上,*二套蛋白质有相似的氨基酸序列,表明它们可能来自共同的祖先*。单个电子从 $P680^*$ 传给 1 分子**褐藻素 a**(Pheo a;Mg^{2+} 被 2 个质子取代的 Chl a),可能经过 1 分子 Chl a 的传递,然后传给一个称为 Q_A 的质体醌-Fe(II)复合物。最终,2 个电子被传递给第二个质体醌分子——Q_B,每次传递 1 个电子,Q_B 接着从类囊体膜的基质表面摄取 2 个质子,产生的氢醌 Q_BH_2 与膜结合的质体醌分子库进行交换。DCMU 以及其他许多除草剂,与质体醌竞争 PSII 的 Q_B 结合位点,从而抑制光合作用。

544

通过细胞色素 b_6f 复合物电子传递产生质子梯度

电子从质体醌库传递,通过细胞色素 b_6f 复合物。这个整合在膜中的装配,和它的细菌对应物细胞色素 bc_1(见节 18-2B)以及线粒体中的电子传递复合物 III(见节 17-2E)十分相似,含有一分子**细胞色素** ***f***(cytochrome *f*,*f* 代表 feuille,在法语中是树叶的意思)、一分子含 2 个血红素的细胞色素 b_6、一个[2Fe-2S]蛋白质和一个结合性氢醌。电子流通过细胞色素 b_6f 复合物可能是经由 Q 循环进行的(图 17-13),从而每传递一个电子要将 2 个质子转位跨过类囊体膜。由 OEC 产生的来自 2 分子 H_2O 的 4 个电子导致 8 个 H^+ 从基质转移到类囊体腔中。*通过细胞色素 b_6f 复合物的电子传递产生了电化学质子梯度的大部分,后者推动了叶绿体中 ATP 的合成。*

细胞色素 *f* 是细胞色素 b_6f 复合物中 4 个多肽中最大的一个。萝卜的细胞色素 *f* 由 285 个残基组成,靠近 C 末端有一个跨膜片段(251～270 位残基);蛋白质的 N 末端 250 个残基可能伸入类囊体腔内。细胞色素 *f* 的 252 个残基的 N 端片段的 X 射线结构揭示出这是一个伸长的双结构域蛋白质(图 18-15)。虽然细胞色素 *f* 含一个血红素 *c* 基团,但是它以 β 折叠为主的结构与其他 *c* 型细胞色素的结构(例如图 6-26、6-31 和 10-5)显著不同。

细胞色素 b_6f 复合物的末端电子载体细胞色素 *f* 和 PSI 之间的电子传递,是由位于类囊体腔表面的外周膜蛋白——质体蓝素(PC)介导的(图 18-11)。这个可移动的 10.5kDa 单体的含 Cu 氧还中心,在其 Cu(I)和 Cu(II)氧化态之间循环。白杨叶的 PC 的 X 射线结构表明,Cu 原子

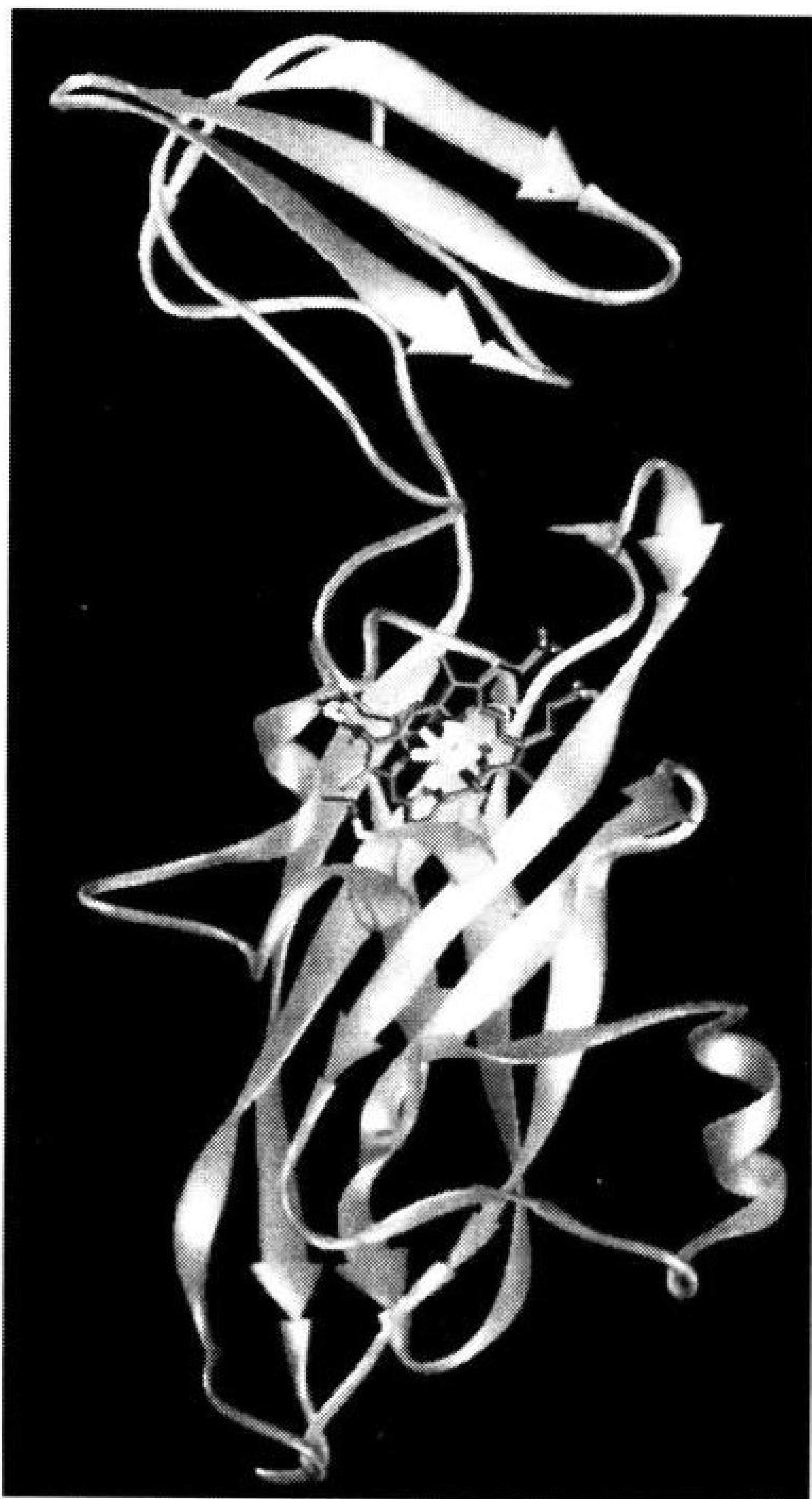


图 18-15 萝卜细胞色素 f 的带状示意图
血红素基团和将血红素与蛋白质共价相连的基团(Cys21、Cys24、His25 和 N 末端氨基)以棒形表示,其中 C、N、O 和 S 原子分别用绿、蓝、红和黄色表示,血红素的 Fe 原子以橙色圆球表示。在蛋白质表面形成一个正电荷斑的 5 个 Lys 和 Arg 残基用深蓝色表示。[基于 Purdue University 的 Janet Smith 提供的 X 射线结构]



图 18-16 白杨叶质体蓝素(PC)的带状示意图
这一具有 99 个残基的单体蛋白质是蓝色铜蛋白家族的一员,它折叠形成一个 β 夹心结构。其 Cu 原子(橙色球)在 Cu(I)和 Cu(II)氧化态之间交替,与 His37、Cys84、His87 和 Met92 的侧链形成四面体配位结构。这些残基以棒形表示,其 C、N 和 S 原子分别用绿、蓝和黄色表示。形成蛋白质表面负电荷斑的 6 个保守的 Asp 和 Glu 残基用红色表示。[引自 an X-ray structure by Mitchell Guss and Hans Freeman, Uniuersity of Sydney, Australia]

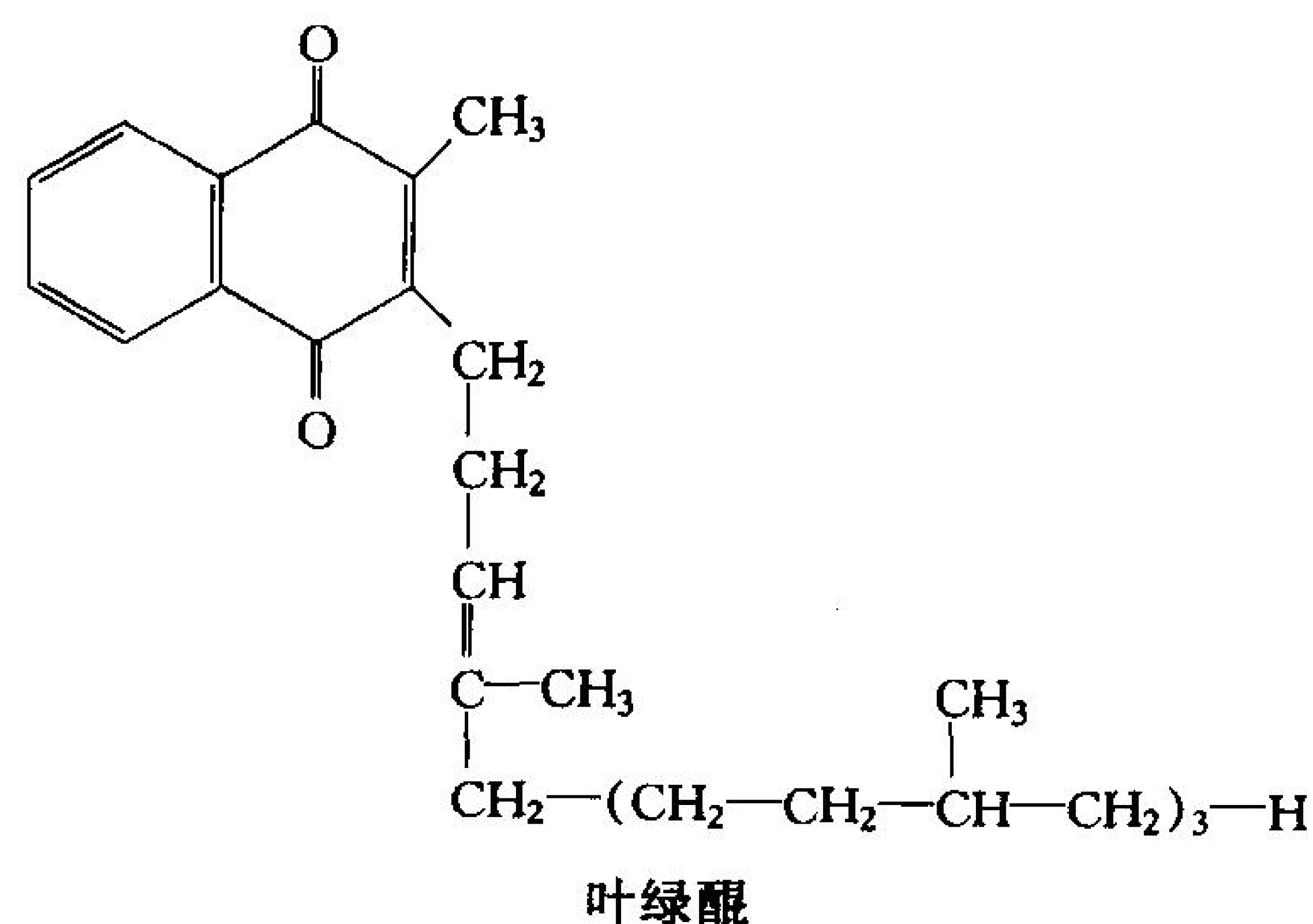
545 和一个半胱氨酸、一个甲硫氨酸和二个组氨酸残基配位,形成一个扭曲的四面体几何结构(图 18-16)。Cu(II)与 4 个配体形成的复合物,一般采用平面正方形的配位结构,而 Cu(I)与 4 个配体形成的复合物则通常为四面体结构。显然,PC 中 Cu(II)与蛋白质之间形成的四面体配位结构的张力促使它还原为 Cu(I)。这种假说可以解释 PC 的标准还原势(0.370V)比正常的 Cu(II)/ Cu(I)半反应标准还原势(0.158V)高,并说明蛋白质可以调节其氧还中心的还原势。对质体蓝素而言,这有助于电子从细胞色素 b_6f 复合物向 PSI 转移。

细胞色素 f 和 PC 的结构可以说明这些蛋白质是如何结合的。细胞色素 f 中的 Lys187,是位于蛋白质表面 5 个带正电荷的一组保守残基之一,它可以和 PC 的保守性负电荷表面斑中的

Asp44 交联。这两个蛋白质很有可能通过静电作用结合，这和细胞色素 *c* 在线粒体电子转移链中与其氧还伙伴的相互作用非常相似(见节 17-2E)。

PSI 激发电子的两种途径

PSI 由两个有 45% 相同性约 83kDa 的大蛋白质亚基 **PsaA** 和 **PsaB**，9 个小亚基(4～16kDa)，无数叶绿素 a 分子(蓝细菌中约 100 个，真核生物中约 200 个)，10～25 个类胡萝卜素分子，3 个[4Fe-4S]簇和 2 分子**叶绿醌**(phylloquinone)(右图)组成。



叶绿醌

Wolfram Saenger 测定了嗜热蓝细菌 *Synechococcus elongatus* 的 PSI 的低分辨率(4 Å)X 射线结构(图 18-17a)。这个蛋白质是一个对称的三聚体，每个单体包含 11 种以上的蛋白质。在一个单体中总共可以鉴定到 31 个跨膜螺旋，大多数螺旋都大致垂直于膜平面。

546

位于 PSI 核心的辅基排列接近二重对称(图 18-17b)，这是由于其 PsaA 和 PsaB 亚基的同源性。二个叶绿素 a 分子相互平行，间隔 9Å，并且接近局部二重对称轴，被认为是 P700，即 PSI 的光子吸收中心。这些叶绿素 a 分子与细菌光合反应中心中的特异配对相似。有意思的是，P700 两侧有二个彼此对称的叶绿素 a 分子，这种方式使人联想起细菌光合反应中心的辅助性 BChl 分

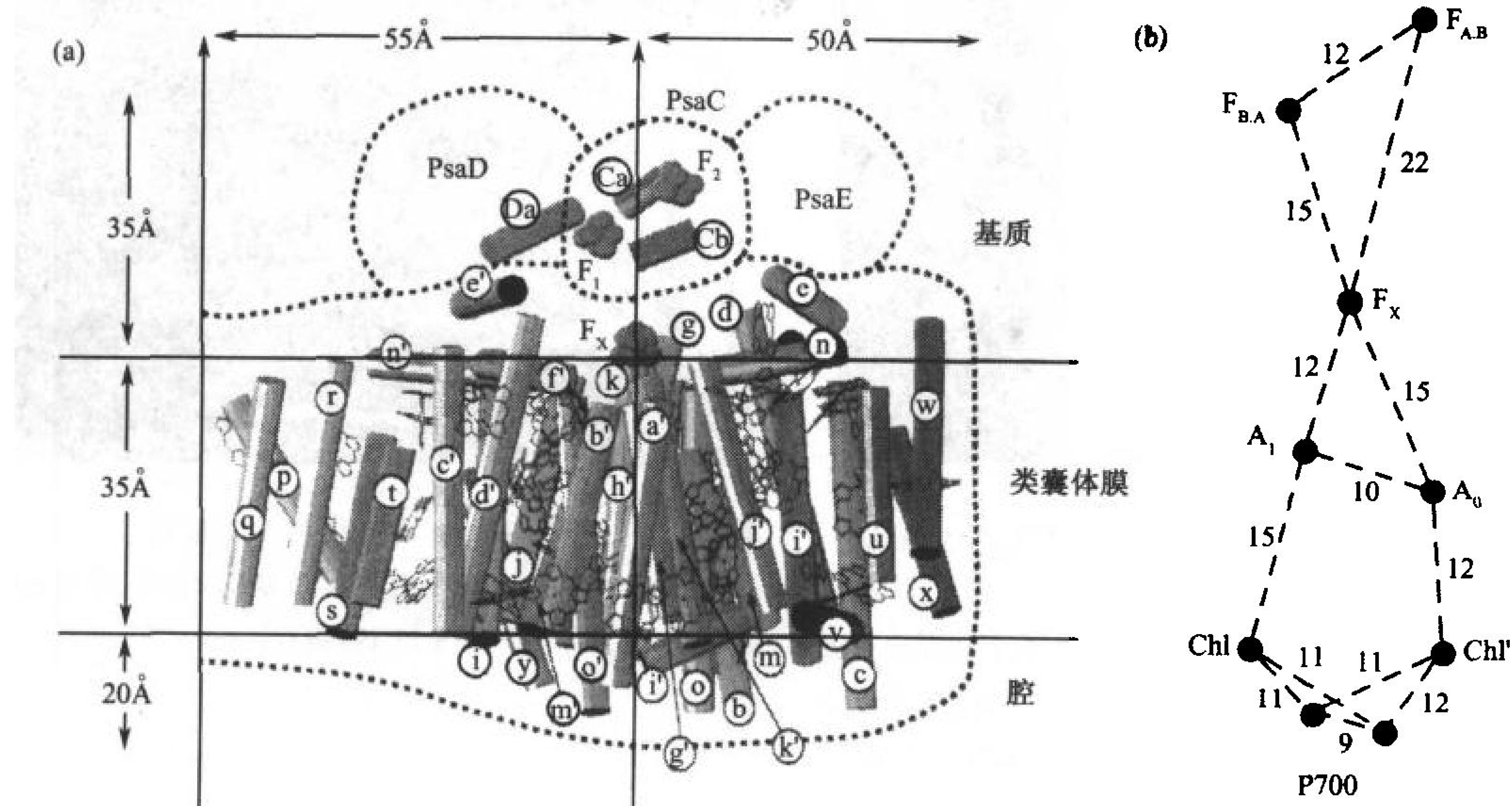


图 18-17 蓝细菌 *Synechococcus elongatus* PSI 亚基的低分辨率结构

(a) 基质面朝上，从类囊体膜内观察，蓝色和青绿色的跨膜螺旋属于 PsaA 和 PsaB，PsaC、PsaD 和 PsaE 是 PSI 位于基质中的亚基。Chl a 的卟啉环用线条模型表示，[Fe-S]簇用红球表示。位于 F_x 中心的假二重对称轴用刺状箭头表示(中心)，而 PSI 三聚体的三重对称轴用实体箭头(左边)表示。(b) 与(a)近似视角观察电子载体中心的排列方式，中心之间的距离以 Å 为单位。

子的排列(图 18-9)。但是,PSI 中的电子转移与紫色光合细菌不同。

P700 的光氧化产生 $P700^+$,这种弱氧化剂直接从质体蓝素接受一个电子。在 P700 的还原侧,电子通过还原势逐渐增加的电子载体链传递(图 18-12 的右侧)。这些载体中的第一个,被称为 A_0,看来是 Chl a;第二个载体,A_1,可能是叶绿醌。最后电子通过 3 个[4Fe-4S]簇,分别被称为 F_x、F_A 和 F_B。PSI 中其余的众多叶绿素和类胡萝卜素分子则作为内在的集光复合物起作用,将光能汇集到 P700。

PSI 逐出电子可能有两种可交替的途径:

1) 大多数电子沿**非循环途径**(noncyclic pathway)从 PSI 流向一个 11kDa 含[2Fe-2S]的可溶解性**铁氧还蛋白**(ferredoxin, Fd),Fd 位于基质中。两个被还原的 Fd 分子依次作用,每次将一个电子传递给由 314 个残基组成的单体酶——铁氧还蛋白-$NADP^+$ 还原酶(**FNR**;图 18-18),因而 FNR 的 FAD 辅基通过双电子还原反应将电子转移给 $NADP^+$ 之前,顺序应为中性的半醌和完全还原态。这个反应顺序产生了叶绿体光反应的最终产物 NADPH。

547

2) 有些电子通过细胞色素 b_6 从 PSI 回到质体醌库,因而形成一条**循环途径**(cyclic pathway),这条途径将质子转位,跨过类囊体膜(图 18-12)。注意:循环途径不依赖于 PSII 的作用,因此结果不产生 O_2。

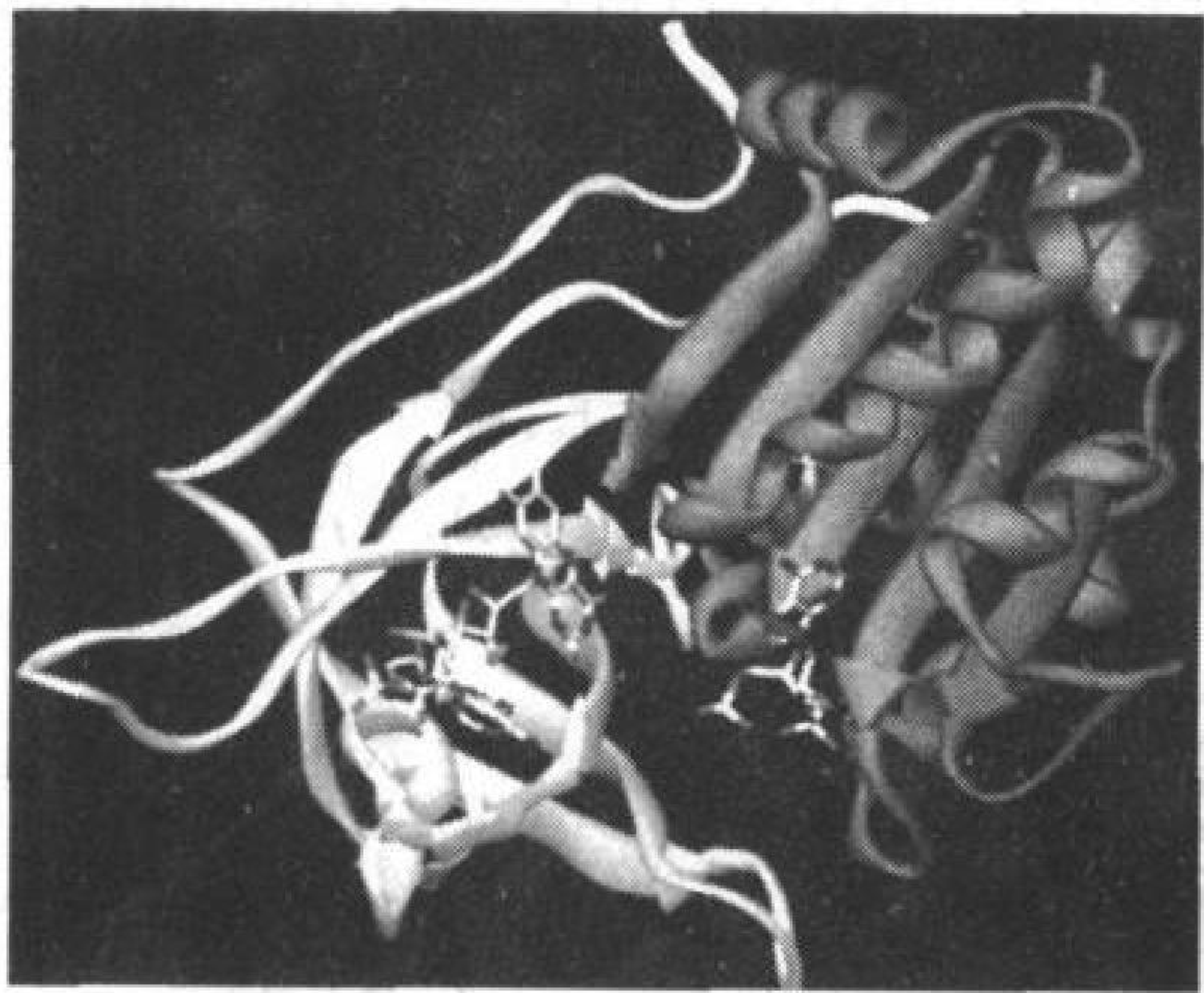


图 18-18 菠菜铁氧还蛋白-$NADP^+$ 还原酶的带状示意图

残基 1~161(金色)折叠成一个反平行的 β 桶,其中含有 FAD 结合位点。残基 162~314(洋红)提供 $NADP^+$ 的结合位点的大部分,形成一个结合二核苷酸的折叠(图 6-29)。FAD 和 2′-磷酸 AMP(代表 $NADP^+$ 结构的一部分)用棒形表示,其 C、N、O 和 P 原子分别用绿、蓝、红和黄色表示。在面对观察者的结构域之间的裂口很可能是铁氧还蛋白的结合位点。(引自 an X-ray structure by Andrew Karplus, Cornell University, and Jon Herriott, University of Washington)

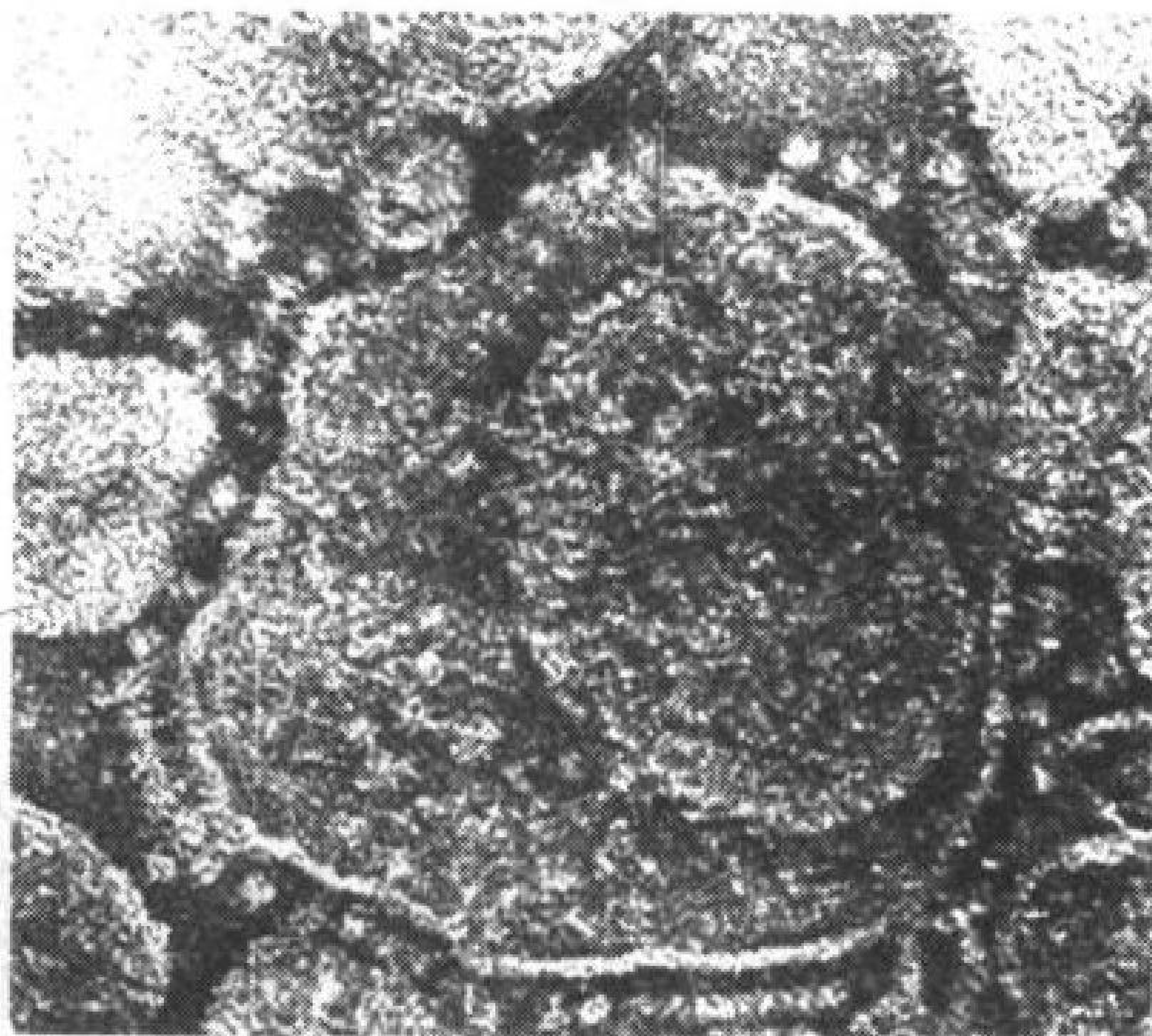


图 18-19 类囊体的电镜照片

其 ATP 合酶的 CF_1"巨头噬菌体"从基质面突出,可将这张图与图 17-19a 进行比较。

循环式电子流动相对于通过 NADPH 的 ATP 合成可能增加了 ATP 合成的水平，因此允许细胞根据其需要调整这两种物质的产生。但是，在循环式和非循环式途径之间分配电子的机制尚不清楚。对光反应的精细调节也取决于 PSI 和 PSII 分隔在类囊体的不同部分(见框 18-2)。

框 18-2　生物化学焦点

PSI 和 PSII 的分隔

冰冻断裂-冰冻蚀刻电镜(见节 10-2)表明类囊体膜的蛋白质复合物有特征性分布(见下图)。

1) PSI 主要位于未堆积的基质片层，与基质接触，可以与基质中的 $NADP^+$ 接近。

2) PSII 几乎只位于紧密堆积的基粒之间，不能与基质直接接触。

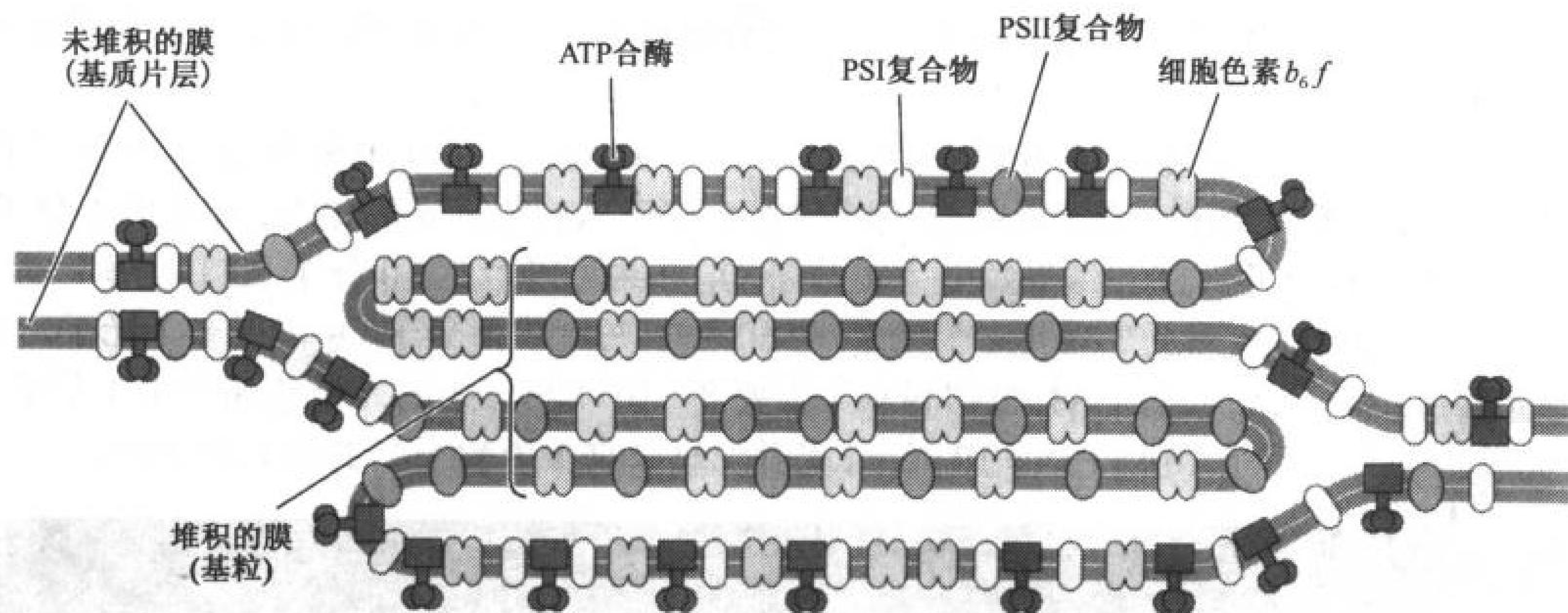
3) 细胞色素 b_6f 均匀地分布在整个膜上。

这些颗粒之间来回传递电子的电子载体——质体醌和质体蓝素，具有很高的可移动性，从而使光合作用得以按适当速度进行。

PSI 和 PSII 彼此分隔的作用是什么呢？如果这两个光反应系统紧密相邻，由于 PSII 的激发能更高(P680 对 P700 而言)，会导致它的大部分吸收的光子通过激发转移传递给 PSI；也就是说，PSII 将作为 PSI 的集光天线起作用。这两者之间分开约 100Å 可以排除这一困难。

PSI 和 PSII 在空间上彼此分隔也利于叶绿体对光照的变化作出应答。这两个光反应系统所吸收的相对光量，因集光复合物在类囊体膜的堆积和非堆积部分的分布而变化。在强光下(通常的直接阳光照射，含较高比例的短波蓝光)，PSII 比 PSI 吸收更多的光，因而 PSI 吸收电子的速度没有 PSII 提供电子的速度快，所以质体醌主要以还原态存在。被还原的质体醌活化了一种蛋白质激酶，将 LHC 的特定 Thr 残基磷酸化，作为应答，LHC 迁移到类囊体膜的非堆积区域，并在那儿和 PSI 结合，因此更多的入射光汇集到 PSI。

在弱光照下(通常的背阴光照，含较高比例的长波红光)，PSI 吸收电子的速度比 PSII 所能提供电子的速度快，因此质体醌主要以氧化态形式存在，LHC 因而被去磷酸化，并迁移到类囊体膜的堆积区，在那儿与 PSII 结合。叶绿体通过光激活的反馈机制，维持两种光反应系统之间的平衡。



D. 光合磷酸化

叶绿体产生 ATP 的方式与线粒体十分相似，即质子梯度的消减与 ATP 的酶促合成相偶联(见节 17-3)。和氧化磷酸化一样，光合磷酸化需要完整的类囊体膜，并可被 2，4-二硝基苯酚这

类化合物作用而与光驱动的电子传递去偶联(图 17-22)。

类囊体膜的基质表面和细菌质膜内表面的电镜照片呈巨头噬菌体形的结构(图 18-19)。这些结构与线粒体中转运质子的 ATP 合酶的 F_1 单位十分相似(图 17-19)。实际上,叶绿体的 ATP 合酶被称为 CF_1CF_0 复合物(C 代表叶绿体),与线粒体的 F_1F_0 复合物惊人地相似。例如,

1) F_0 和 CF_0 单位都是包含质子转位通道的疏水性跨膜蛋白。
2) F_1 和 CF_1 单位都是由 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 亚基组成的亲水性的外周膜蛋白,其中 β 亚基是可逆性 ATPase。

548

3) 两种 ATP 合酶都可被寡霉素和二环己基碳二亚胺(DCCD)抑制。

显然,在有细胞生命的历史初期就出现了转运质子的 ATP 合酶。但是,需要注意,叶绿体 ATP 合酶是将质子转运出类囊体进入基质(图 18-11),而线粒体 ATP 合酶则将质子从膜间隙转运到基质中(图 17-18),这是因为叶绿体基质的局部解剖学和线粒体基质类同。

非循环式电子传递的光合作用每吸收一个光子产生约 1.25 分子 ATP

在饱和的光强度下,叶绿体横跨其类囊体膜产生约 3.5pH 单位的质子梯度,这是两个过程的结果:

1) 从 2 分子 H_2O 生成 1 分子 O_2,释放了 4 个质子到类囊体腔内;
2) 通过细胞色素 b_6f 复合物传递释放 4 个电子,并有 8 个质子从叶绿体基质转运到类囊体腔中。

通过非循环式电子转移每产生一分子 O_2,总共有约 12 个质子进入类囊体腔。

与线粒体内膜相反,类囊体膜对 Mg^{2+} 和 Cl^- 这些离子是通透性的。质子和电子转位通过类囊体膜的同时也伴随着这些离子的通透以维持电中性(Mg^{2+} 出和 Cl^- 进)。这几乎消减了膜的势能 $\Delta\psi$。因此叶绿体中的电化学梯度几乎完全是 pH(浓度)梯度的结果。

549

据估算,叶绿体 ATP 合酶从类囊体腔每转运 3 个质子到基质中可以产生 1 分子 ATP。因此叶绿体中的非循环式电子传递,每释放 1 分子 O_2 可以产生约 12/3 = 4 分子 ATP(循环式电子传递可以产生更多的 ATP,因为通过细胞色素 b_6f 复合物介导的 Q 循环可以将更多的质子转运到类囊体腔中)。

当然,非循环式电子传递还可以产生 NADPH(OEC 从 2 H_2O 中每释放 4 个电子产生 2NADPH)。每分子 NADPH 所含自由能可以产生 3 分子 ATP(见节 17-3C),每产生 1 分子 O_2 总共可以再产生 6 分子 ATP。结果每产生 1 分子 O_2 总共可以产生 10 分子 ATP。每个电子通过从 H_2O 到 NADPH 体系至少需要 2 个光子,也就是说,每产生 1 分子 O_2 需要 8 个光子。这一点得到实验测定的证实,实验表明,植物和藻类需要 8～10 个可见光的光子才能产生 1 分子 O_2。因此,光反应的总效率是 10ATP/8～10 光子,或者说每吸收 1 个光子产生约 1.25ATP。

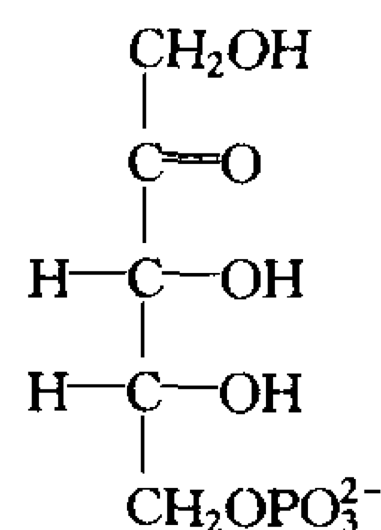
3. 暗反应

在前一节中我们了解了植物如何捕获光能产生 ATP 和 NADPH。在这一节中我们要讨论这些产物如何被用来从 CO_2 合成糖和其他物质。

A. 卡尔文循环

植物吸收 CO_2 生成糖的代谢途径是由 Melvin Calvin、James Bassham 和 Andrew Benson 在

1946年到1953年之间阐明的。他们利用培养的藻类细胞跟踪$^{14}CO_2$放射性标记的代谢去向。Calvin最早的一些实验表明，藻类与$^{14}CO_2$接触一、两分钟后就合成了带同位素标记的复杂的代谢混合产物，包括糖和氨基酸。但分析藻类和$^{14}CO_2$接触5S之内形成的第一个稳定的放射性化合物是**3-磷酸甘油酸**(3-phosphoglycerate, 3PG)，一开始只在其羧基上被标记。这个结果立即提示3PG是由一个C_2化合物羧化而形成的。但是没有找到这样的前体。实际的羧化反应涉及戊糖衍生物**核酮糖-5-磷酸**(Ru5P)(右图)。产生的C_6产物裂解成2个C_3化合物，均为3PG。总的途径见图18-20，被称为**卡尔文循环**(Calvin cycle)或**还原性戊糖磷酸循环**(reductive pentose phosphate cycle)。它涉及戊糖的羧化、糖的生成和Ru5P的再生。



核酮糖-5-磷酸(Ru5P)

550

在寻找羧化反应底物的过程中，还找到了其他几种光合作用的中间产物，并弄清了其标记方式。例如己糖果糖-1,6-二磷酸(FBP)，开始只在其C3和C4位被标记，但后来在其他原子上也出现较低程度的标记。研究被标记碳原子在各种丁糖、戊糖、己糖和庚糖磷酸化合物中的去向，最终推导出如图18-20所示的卡尔文循环，这是代谢生化的里程碑。其中许多假设的反应，用纯化的酶进行体外研究，最终得以证实。

卡尔文循环通过一个两阶段过程从CO_2生成GAP

卡尔文循环可以分为两个阶段：

阶段1：产物生成期(图18-20的第一行)，在这一时期，3分子Ru5P与3分子CO_2反应产生6分子**甘油醛-3-磷酸**(GAP)，消耗了9分子ATP和6分子NADPH。这一途径的循环性质使这一过程相当于从3分子CO_2合成1分子GAP。此GAP可以从循环中抽出用于生物合成。

阶段2：复原期(图18-20中的下面几行)，在这一时期，剩下的5分子GAP中的碳原子经过一系列特殊的反应重新组合成3分子Ru5P，循环籍此开始。这一系列反应与戊糖磷酸途径(见节14-6)十分相似。这一阶段可以概念性地分解成4套反应(数字代表图18-20中的相应反应)：

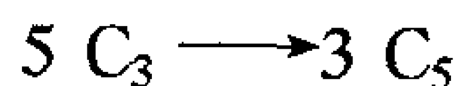

6. $C_3 + C_3 \longrightarrow C_6$


8. $C_3 + C_6 \longrightarrow C_4 + C_5$


9. $C_3 + C_4 \longrightarrow C_7$


11. $C_3 + C_7 \longrightarrow C_5 + C_5$

因此整个过程的化学计量为：



$$5\ C_3 \longrightarrow 3\ C_5$$

注意：卡尔文循环的这一阶段不需要进一步注入自由能(ATP)或还原力(NADPH)。

卡尔文循环的第一步反应是由**磷酸核酮糖激酶**(phosphoribulokinase)催化Ru5P的磷酸化，生成**核酮糖-1,5-二磷酸**(ribulose-1,5-bisphosphate, RuBP)。接着是RuBP的羧化(反应2，见下面的讨论)，生成的3PG首先转化为1,3-二磷酸甘油酸(BPG)，然后再转化为GAP。后面这两步反应是两个连续酵解反应的逆转(见节14-2G和节14-2F)，不同的是卡尔文循环反应用NADPH而不是NADH。

552

卡尔文循环的第二阶段从一个熟悉的酵解反应的逆反应开始，即由丙糖磷酸异构酶催化

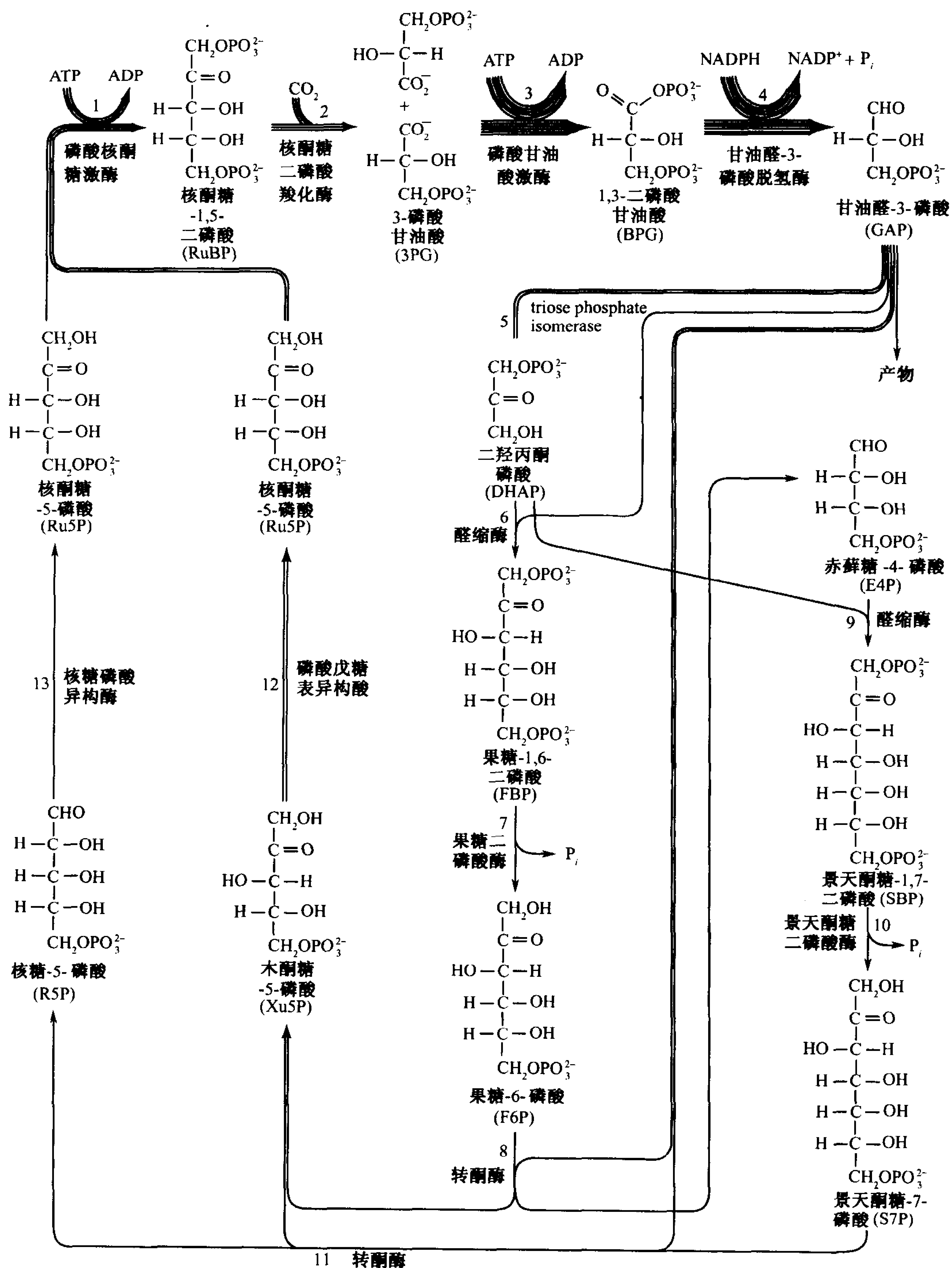


图 18-20 代谢的秘诀：卡尔文循环

箭头内所包含的线条的数目代表将 3 分子 CO_2转化为 1 分子 GAP 这轮循环中参与该步反应的分子数。为了清楚起见，所有的糖均以线条形式表示，虽然已糖和庚糖主要是以环状形式存在。用$^{14}CO_2$ 在一轮循环内产生的^{14}C 标记位点均用红色表示。注意，产物 Ru5P 中的 2 个只在 C3 被标记，而第 3 个 Ru5P 的 C1、C2 和 C3 被均等标记。

GAP 异构为二羟丙酮磷酸(DHAP)(见节 14-2E)。接着,DHAP 沿着两条类似的途径转变:反应 6~8 或者反应 9~11。反应 6 和 9 是醛缩酶催化的羟醛缩合反应,使 DHAP 与一醛基相连。反应 6 也是一个酵解反应的逆反应(见节 14-2D)。反应 7 和 10 是分别由果糖二磷酸酶(FBPase,见节 14-4B)和**景天庚酮糖二磷酸酶**(sedoheptulose bisphosphatase, SBPase)催化的磷酸水解反应。卡尔文循环中其余的反应由也参与戊糖磷酸途径的酶所催化(见节 14-6;它们相符合的阐明也为支持卡尔文循环提供了重要的证据)。反应 8 和 11 都是由转酮酶催化的,一个 C_2 酮基(图 18-20 中的绿色阴影)从酮糖转移给 GAP,形成木酮糖-5-磷酸(Xu5P),而留下醛糖,在反应 8 中是赤藓糖-4-磷酸(E4P),在反应 11 中是核糖-5-磷酸(R5P)。反应 8 产生的 E4P 进入反应 9。反应 8 和 11 产生的 Xu5P 在反应 12 中被**磷酸戊糖差向异构酶**(phosphopentose epimerase)转化为 Ru5P,反应 11 产生的 R5P 也在反应 13 中由**核糖磷酸异构酶**(ribose phosphate isomerase)转化为 Ru5P,因此完成了一轮卡尔文循环。在卡尔文循环的 11 个酶中只有 3 个——磷酸核酮糖激酶、**核酮糖二磷酸羧化酶**(ribulose bisphosphate carboxylase)和 SBPase——在动物组织中没有相应的

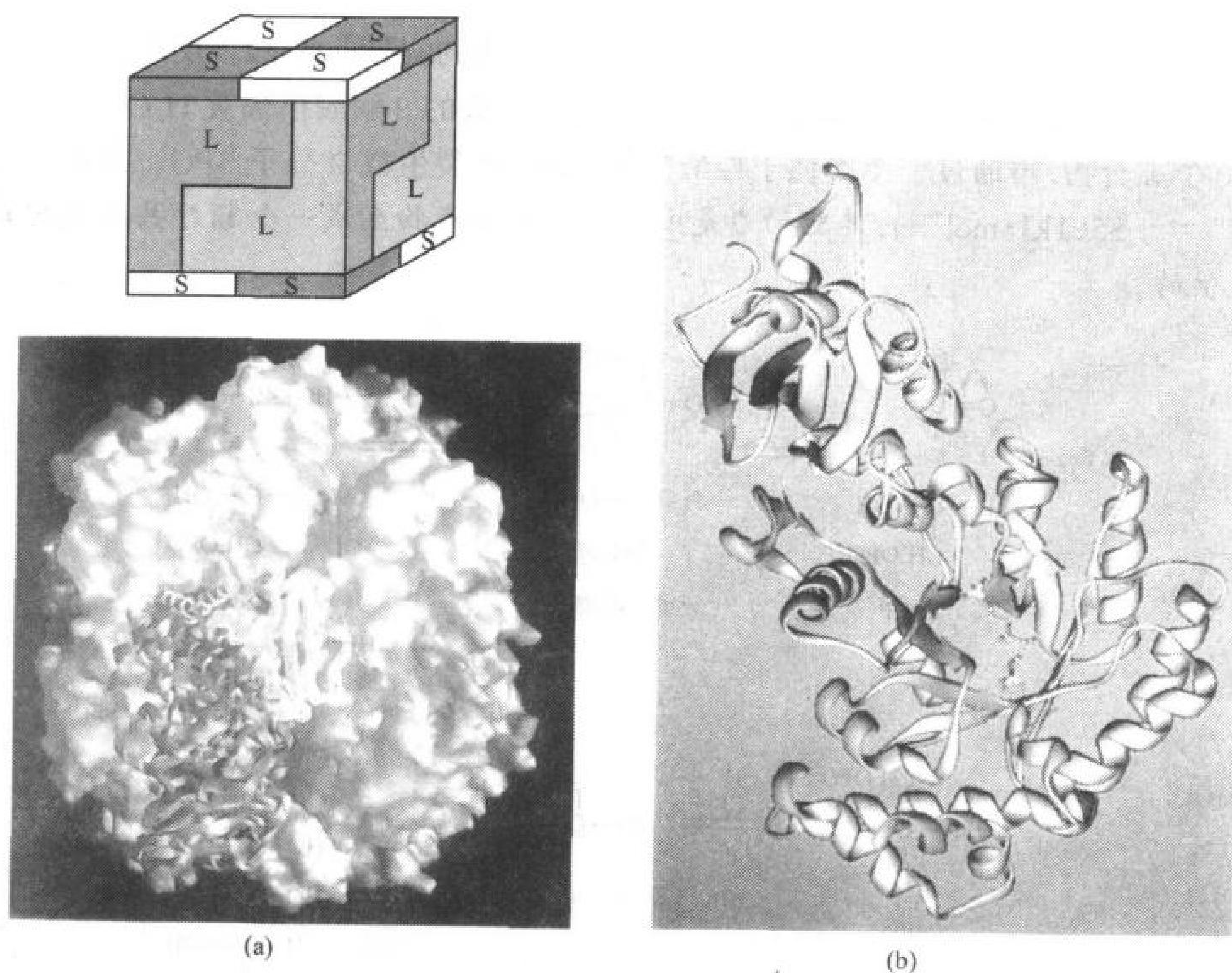


图 18-21　RuBP 羧化酶的 X 射线结构

(a) L_8S_8 蛋白的四级结构。一个 L 亚基和一个 S 亚基用带状表示,其余亚基以范德华表面表示。该蛋白具有 D_4 对称(四方形棱柱对称:图 6-33b),其四重对称轴朝向观察者。伴随的示意图表明,延伸的 L 亚基(在结构图中可以清楚地看见 6 个)可以看成是以二个相互交错的四聚体相互结合,一个从顶上的绿色部分伸展,一个从底部的青蓝色伸展。盖在复合物顶部和底部的 S_4 四聚体的亚基,交替用黄色和橙色表示(下面的 S_4 四聚体只有一个亚基可见)。(b) L 亚基。过渡态抑制剂 2-羧基阿拉伯醇-1,5-二磷酸,用棒状结构表示,位于酶的 α/β 桶状结构域开口处的底物结合位点,相对于(a)中所画的带状形式而言,亚基绕垂直轴旋转取向。(引自 an X-ray structure by David Eisenberg, UCLA)

酶。

RuBP 羧化酶催化 CO_2 的固定

催化 CO_2 固定的酶——核酮糖二磷酸羧化酶[**RuBP 羧化酶**,(RuBP carboxylase)]可能是世界上最重要的酶,因为地球上几乎所有的生命最终都依赖于该酶所催化的反应。这种蛋白质可能由于其催化的效率较低($k_{cat} \approx 3s^{-1}$),占叶子中蛋白质总量的 50%,因此是生物圈中含量最丰富的蛋白质。高等植物和大多数光合微生物的 RuBP 羧化酶由 8 个大亚基(L)和 8 个小亚基(S)组成,大亚基由叶绿体 DNA 编码(烟草叶子中的大亚基由 477 个残基组成),小亚基由核基因编码(123 个残基)。某些光合细菌的 RuBP 羧化酶是一个 L_2 二聚体,其 L 亚基与 L_8S_8 酶的 L 亚基有 28%的序列同源,并且结构上彼此相似。Carl-Ivar Brändén 和 David Eisenberg 的 X 射线研究表明,L_8S_8 酶是一个对称的正方形棱柱(图 18-21a)。L 亚基由一个 β 折叠结构域和一个 α/β 桶状结构域组成,后者包含了酶的催化位点(图 18-21b)。S 亚基的功能还不清楚,证明它像其他酶一样具有调节功能的尝试没有成功。

RuBP 羧化酶被接受的作用机制主要是由卡尔文提出的,见图 18-22。反应的限速步骤是抽取 RuBP 的 C3 质子,产生一个烯醇酸亲核进攻 CO_2。生成的 β 酮酸很快被 H_2O 在其 C3 位上进攻,产生一个加合物,再通过一个类似于羟醛裂解反应,分裂生成 2 分子 3PG。*总反应是高度放能的($\Delta G^{\circ\prime} = -35.1 kJ \cdot mol^{-1}$),其驱动力是由 β 酮酸中间产物生成一个额外共振稳定羧基的裂解反应提供的。*

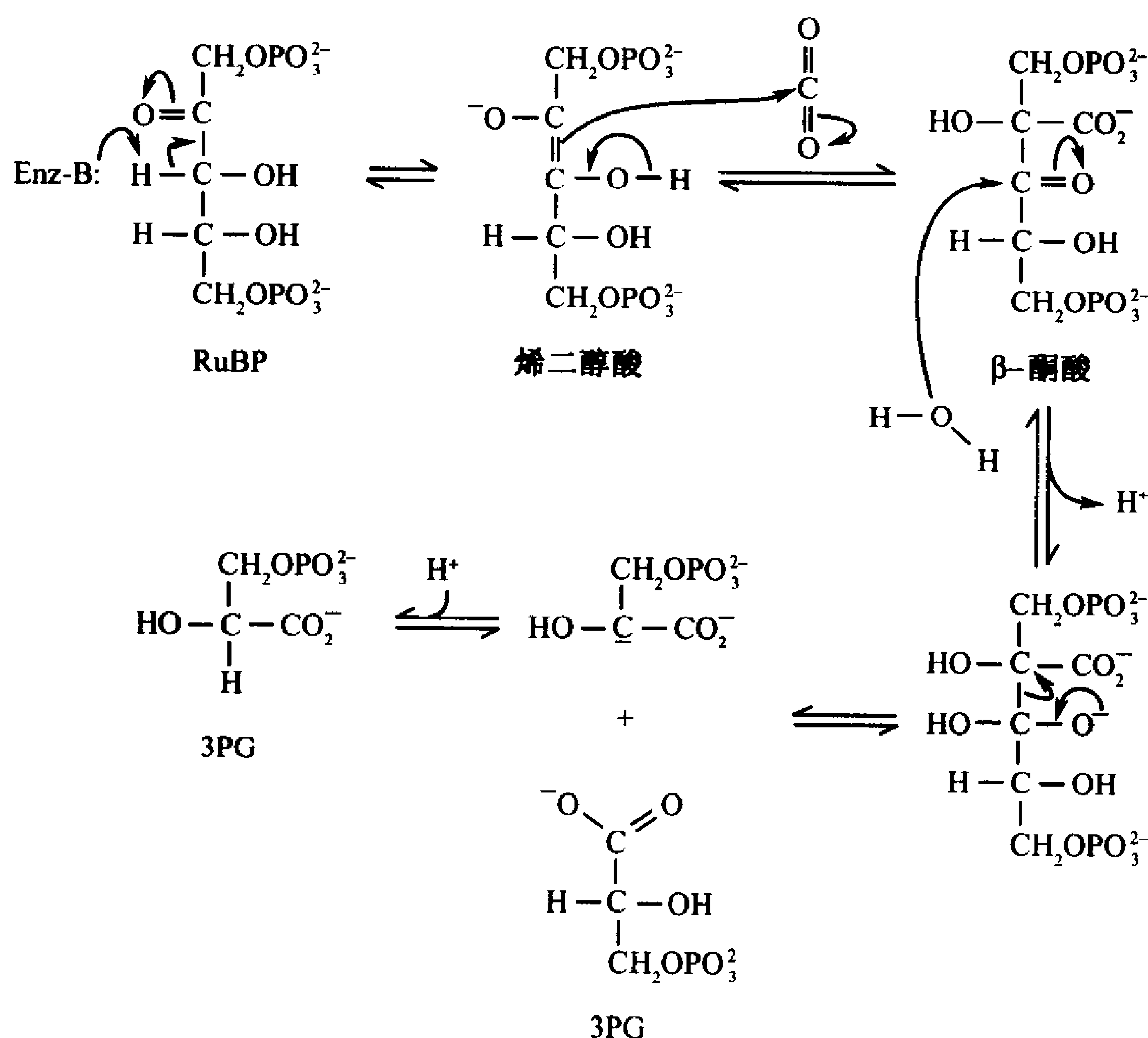


图 18-22 RuBP 羧化酶反应的机制

反应通过一个烯二醇酸中间产物进行,该中间产物亲核进攻 CO_2 形成 β 酮酸,再与水反应产生 2 分子 3PG。

RuBP 羧化酶的活性需要 Mg^{2+}，Mg^{2+} 可能稳定住在催化过程中形成的负电荷。一定程度上，Mg^{2+} 通过一个在催化作用中十分重要的氨甲酸基（—NH—COO^-）与酶结合，该氨甲酸基是由一个非底物 CO_2 与 Lys 201 的 ε-氨基反应产生的。这个重要反应在体内由 **RuBP 羧化酶活化酶**（RuBP carboxylase activase）催化，反应需要 ATP 驱动。 554

GAP 是葡萄糖-1-磷酸和其他生物合成产物的前体

卡尔文循环的总化学计量式为



$$3CO_2 + 9ATP + 6NADPH \longrightarrow GAP + 9ADP + 8P_i + 6NADP^+$$

光合作用的原发产物 GAP，在叶绿体内和叶绿体外均可用于各种生物合成途径。例如，它可以在卡尔文循环各种酶的进一步作用下转化为果糖-6-磷酸，然后再被磷酸葡萄糖异构酶和磷酸葡萄糖变位酶转化为葡萄糖-1-磷酸（见节 15-1C）。G1P *是植物特有的更高级糖的前体*。其中最重要的包括蔗糖（见节 8-2A），这是植物将糖转运到非光合作用细胞时的主要转运糖；还有淀粉（见节 8-2C），植物的主要贮存多糖；以及纤维素（见节 8-2B），植物细胞壁的基本结构组分。在合成所有这些物质时，根据植物种类不同和途径不同，G1P 可以形成 ADP-、CDP-、GDP-或 UDP-葡萄糖（见节 15-5）而被活化，然后葡萄糖单位被转移到延伸中的多糖链的非还原端，正如发生在糖原合成时那样（见节 15-2B）。

B. 卡尔文循环的调控

在白天，植物通过光合作用的光反应和暗反应满足其能量需求。但是在晚上，像其他有机体一样，植物必须通过糖酵解、氧化磷酸化和磷酸戊糖途径，利用其营养贮存产生 ATP 和 NADPH。因为基质中除了含有卡尔文循环的有关酶外，也含有糖酵解和磷酸戊糖途径的酶，因此*植物必须具有一套对光敏感的调控机制，防止卡尔文循环以浪费能量的无效循环方式，消耗这些通过分解代谢产生的* ATP *和* NADPH。

正如我们所知道的，代谢途径通量的调控，发生在那些严重偏离平衡的酶促反应步骤（高负值的 ΔG）。观察表 18-1 可知，在卡尔文循环中可以调控通量的 3 个最佳候选者是由 RuBP 羧化酶、FBPase 和 SBPase 催化的反应（图 18-20 中的反应 2、7 和 10）。事实上，这 3 个酶的催化效率在体内都随着光照水平而改变。

表 18-1 卡尔文循环中各反应的标准和生理自由能变化

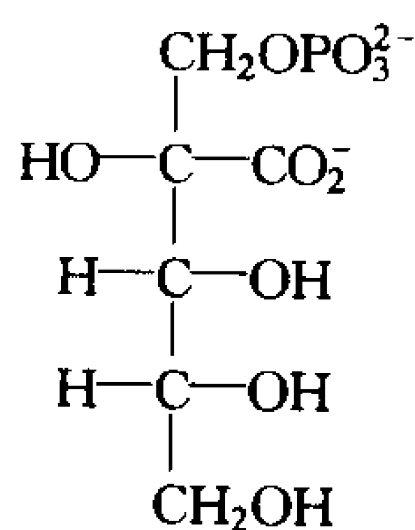
步骤[a]	酶	$\Delta G^{\circ\prime}$ /(kJ·mol^{-1})	ΔG /(kJ·mol^{-1})
1	磷酸核酮糖激酶	-21.8	-15.9
2	核酮糖二磷酸羧化酶	-35.1	-41.0
3+4	磷酸甘油酸激酶甘油醛-3-磷酸脱氢酶	+18.0	-6.7
5	丙糖磷酸异构酶	-7.5	-0.8
6	醛缩酶	-21.8	-1.7

续表

步骤[a]	酶	$\Delta G^{o\prime}$ /(kJ·mol^{-1})	ΔG /(kJ·mol^{-1})
7	果糖二磷酸酶	-14.2	-27.2
8	转酮酶	+6.3	-3.8
9	醛缩酶	-23.4	-0.8
10	景天酮糖二磷酸酶	-14.2	-29.7
11	转酮酶	+0.4	-5.9
12	磷酸戊糖表异构酶	+0.8	-0.4
13	核糖磷酸异构酶	+2.1	-0.4

[a]参见图 18-20

引自Bassham. J. A. and Buchanan, B. B. , in Govindjee(Ed.), Photosynthesis, Vol. II, P. 155, Academic Press(1982)。



2-羧基阿拉伯糖醇-1-磷酸(CA1P)

RuBP 羧化酶的活性受三种依赖于光的因素影响：

1) pH。在光照条件下，基质中的 pH 值从约 7.0 上升到约 8.0，因为质子从基质被泵到类囊体腔中。RuBP 羧化酶在 pH8.0 附近有一尖锐的最适 pH 峰。
2) [Mg^{2+}]。回忆光照引起的质子流入类囊体腔伴随着 Mg^{2+} 流出到基质中(见节18-2D)，这个Mg^{2+} 激活RuBP羧化酶。
3) 过渡态类似物 **2-羧基阿拉伯糖醇-1-磷酸**(2-carboxyarabinitol-1-phosphate, CA1P)。

555

许多植物合成这一化合物，它只在黑暗中抑制 RuBP 羧化酶。RuBP 羧化酶活化酶除了可以催化 RuBP 氨甲酰化外，也可以促进这个紧密结合的 CA1P 从 RuBP 羧化酶上解离。

FBPase 和 SBPase 也都可因 pH 值和[Mg^{2+}]的升高而被活化，也可以被 NADPH 激活。这些因素的作用可以被第二个调节系统所补充，这个系统对基质中的氧化还原势作出应答。**硫氧还蛋白**(thioredoxin)是一种 12kDa 的蛋白质，存在于多种类型的细胞中，含有一个可以被可逆还原的半胱氨酸二硫基。还原型硫氧还蛋白可以通过二硫基交换反应(图 18-23)活化 FBPase 和 SBPase。硫氧还蛋白的氧还水平由第二个含二硫基的酶——**铁氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶**(ferredoxin-thioredoxin reductase)来维持，该酶直接对基质中可溶性的铁氧还蛋白的氧还状态作出应答，而后者又随光照水平而变化。硫氧还蛋白体系也可以使糖酵解(见节 14-4A)中调节通量的主要酶——硫酸果糖激酶(PFK)失活。因此，在植物中，*光刺激卡尔文循环，同时抑制糖酵解，而黑暗则具有相反的效应(也就是所谓的暗反应不能发生在黑暗中)*。

556

C. 光呼吸

20 世纪 60 年代就已经知道，*受光照的植物可以经过一条不同于氧化磷酸化的途径消耗* O_2

释放 CO_2。实际上，在低 CO_2、高 O_2 水平下，**光呼吸**(photorespiration)过程超过了光合作用对 CO_2 的固定。光呼吸的基础是出乎意料的：O_2 作为 RuBP 羧化酶的底物与 CO_2 竞争[RuBP 羧化酶因此也被称作 **RuBP 羧化酶-加氧酶**(RuBP carboxylase-oxygenase)或者 **rubisco** 酶]。在加氧酶催化的反应中，O_2 与酶的另一个底物 RuBP 反应，生成 3PG 和 **2-磷酸乙醇酸**(2-phosphoglycolate)(图 18-24)。2-磷酸乙醇酸被**乙醇酸磷酸酶**(glycolate phosphatase)水解成**乙醇酸**(glycolate)，并且如下所述：通过发生在**过氧化物酶体**(peroxisome)和线粒体中的一系列酶促反应，被部分氧化产生 CO_2。因此光化学似乎是一个浪费的过程，破坏了光合作用的一些工作。在这一节，我们讨论光呼吸的生化基础以及某些植物如何设法避免其有害的作用。

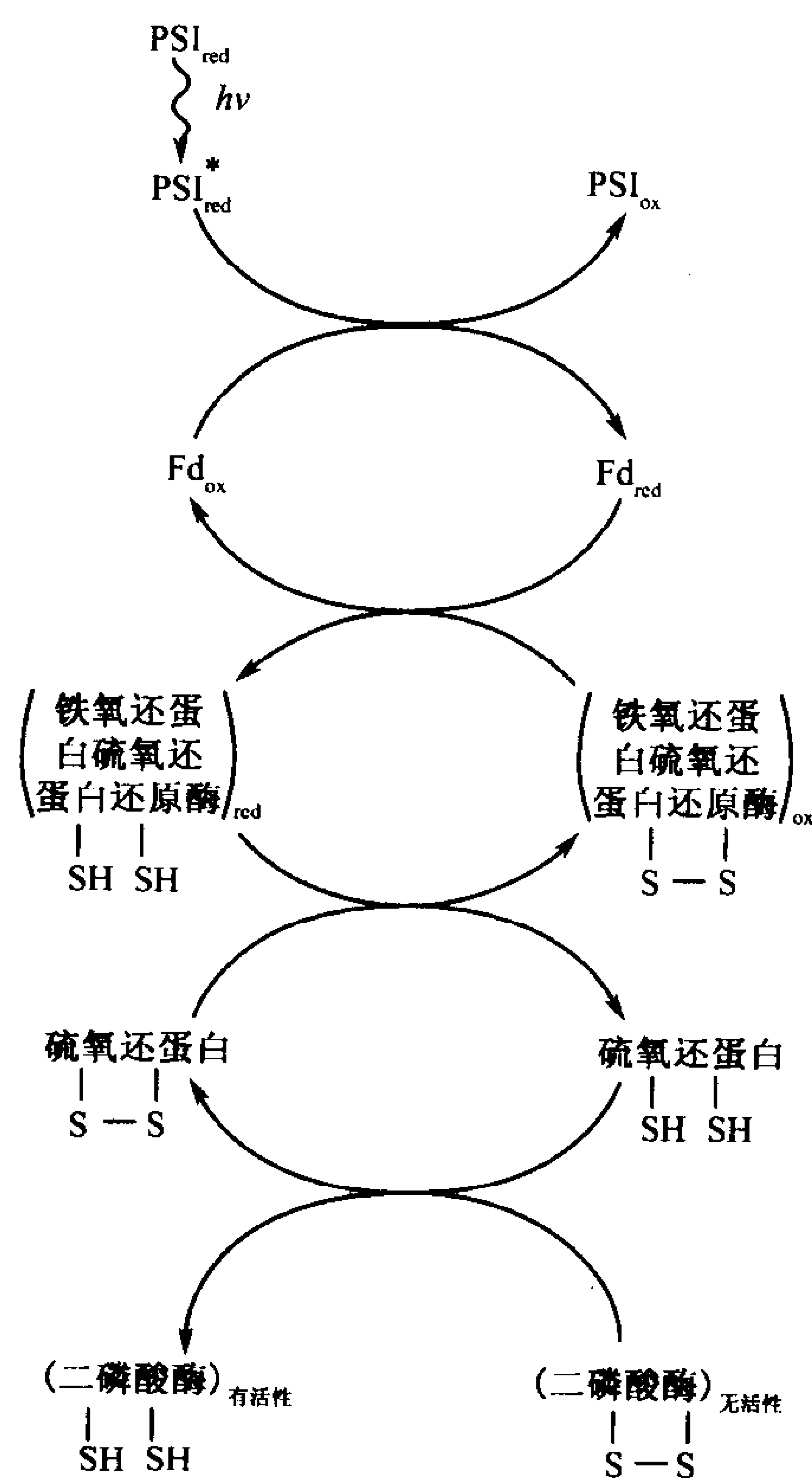


图 18-23　FBPase 和 SBPase 的光活化机制

被光活化的 PSI 还原可溶性的铁氧还蛋白(Fd)，Fd 再还原铁氧还蛋白-硫氧还蛋白还原酶，后者再还原硫氧还蛋白中的二硫键。被还原的硫氧还蛋白通过二硫键交换作用与没有活性的二磷酸酶反应，从而活化这些控制卡尔文循环通量的酶。

光呼吸消耗 ATP 和 NADPH

光呼吸的途径概括在图 18-25 中。乙醇酸从叶绿体被运送到过氧化物酶体(也称乙醛酸循环体；见节 16-5C)，在此被**乙醇酸氧化酶**(glycolate oxidase)氧化为乙醛酸和 H_2O_2。H_2O_2 是一种潜在的有害的氧化剂，可以被含血红素的酶——过氧化氢酶(见节 17-5C)转化为 H_2O 和 O_2。乙醛酸可以通过转氨反应转化为甘氨酸，如节 20-2A 讨论的那样，并且转运到线

557

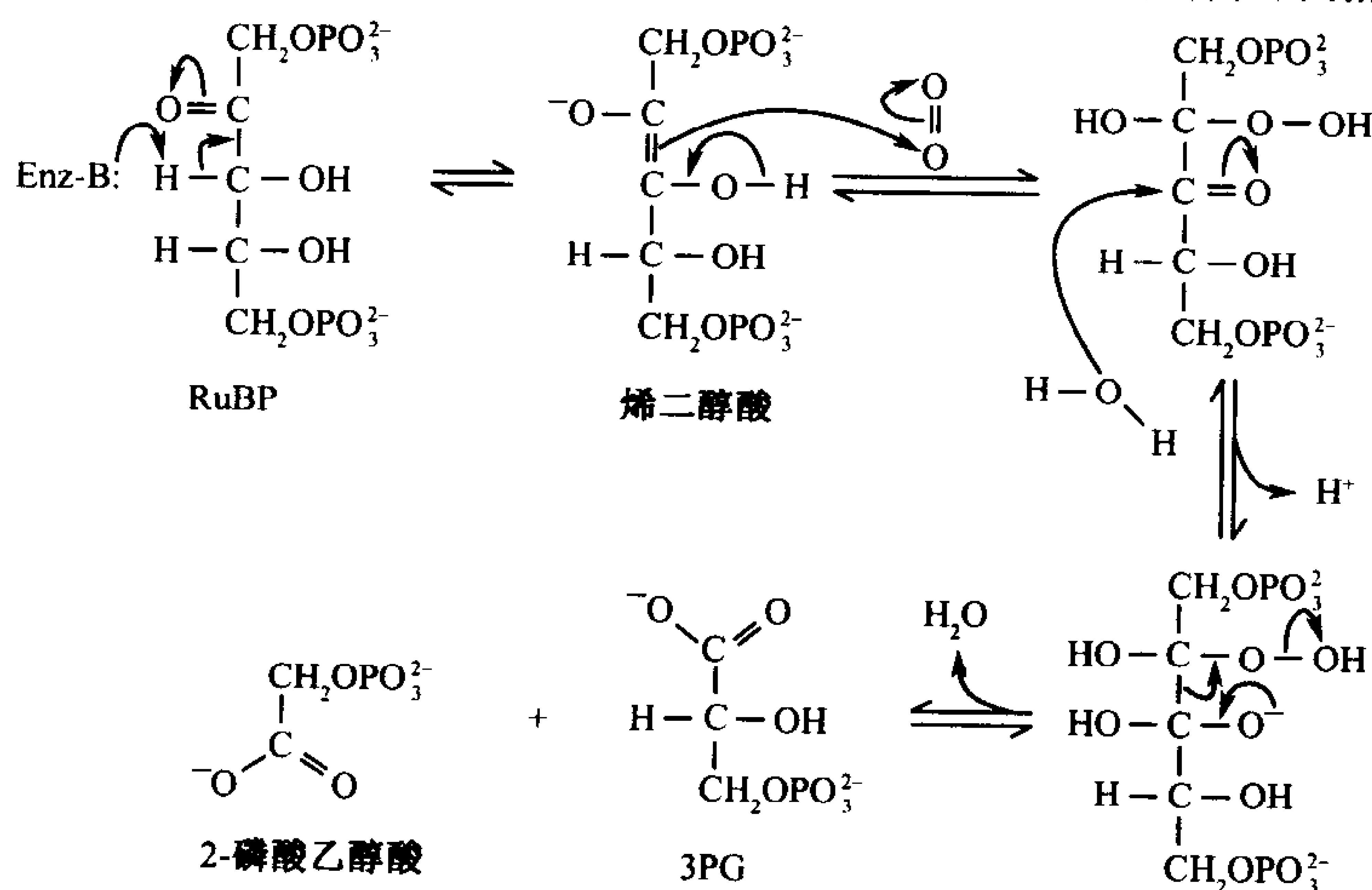


图 18-24　RuBP 羧化酶-加氧酶催化的加氧酶反应的可能机制

注意：该反应机理与同一酶催化的羧化酶反应机制的相似性(图 18-22)。

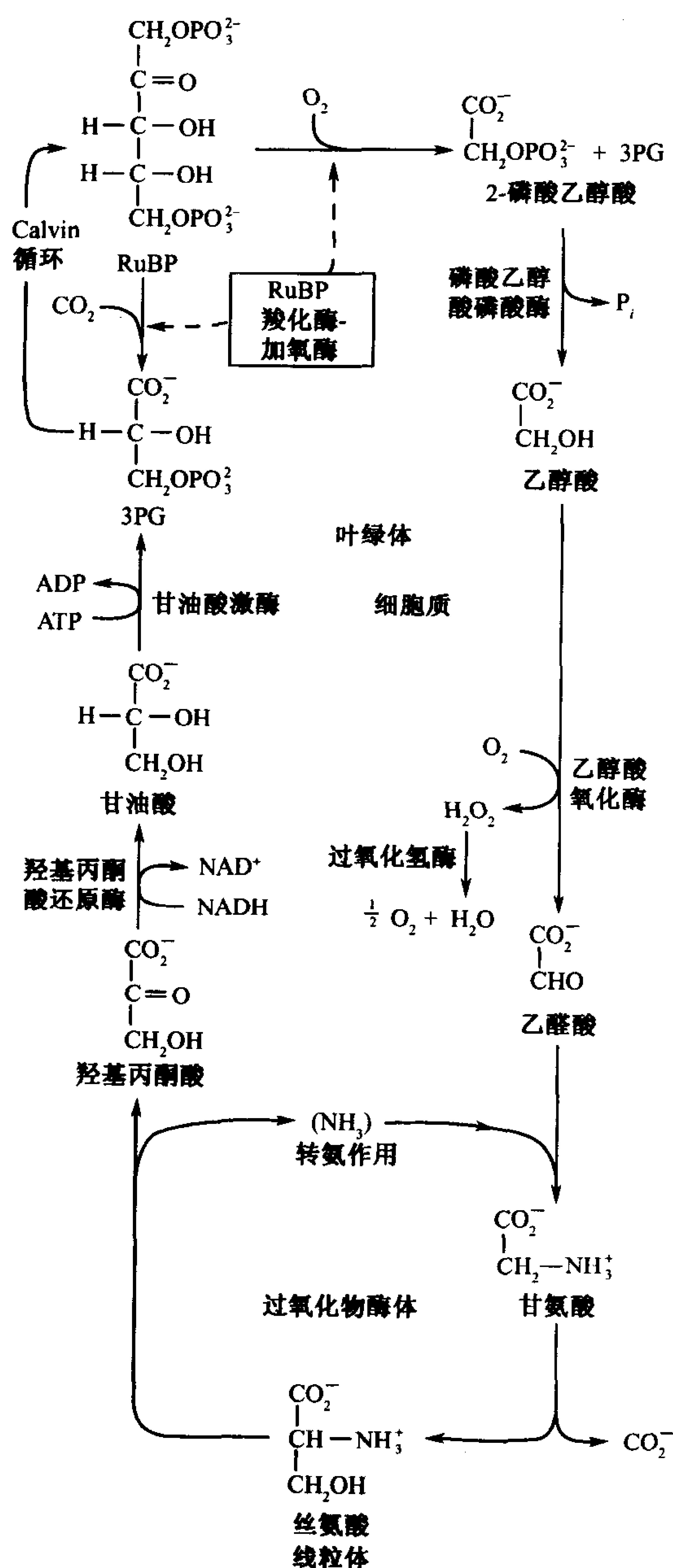


图 18-25　光呼吸

这一途径代谢了由 RuBP 羧化酶催化的 RuBP 氧化产生的磷酸乙醇酸。如图所示，这些反应发生在叶绿体、过氧化物酶体、线粒体和细胞质中。注意，生成丝氨酸和 CO_2 需要 2 分子甘氨酸。

粒体中。在那儿，2 分子甘氨酸转化为一分子丝氨酸和一分子 CO_2。这就是光呼吸产生的 CO_2 的来源。丝氨酸被回运到过氧化物酶体，并经转氨反应转化为**羟基丙酮酸**(hydropyruvate)。羟基丙酮酸被还原为**甘油酸**(glycerate)，并在细胞质中被磷酸化为 3PG，3PG 重新进入叶绿体，在卡尔文循环中转化为 RuBP。这个复杂的光呼吸循环的净结果是由光反应产生的一些 ATP 和

NADPH 被毫无意义地消耗掉了。

虽然光呼吸没有已知的代谢功能，但是迄今测定的许多不同的光合有机体的 RuBP 羧化酶都有加氧酶活性。然而，长时间进化的压力定已优化了这种重要酶的功能。光呼吸可能赋予植物体一种选择优势，在没有足量 CO_2 存在时，它消耗其吸收的光能，以保护光合有机体免受光氧化的损害。这种假说得到下述观察结果的支持，当叶绿体或绿叶细胞在既无 CO_2 又无 O_2 存在时被强光照射，其光合作用能力迅速不可逆地丧失了。 558

C_4 植物浓缩 CO_2

在阳光灿烂的炎热白天，当光合作用消耗了叶绿体中的 CO_2 并使 O_2 浓度增加，光呼吸的速度就会接近光合作用的速度。这种现象是限制许多植物生长的主要因素(因此也是一个重要的农业问题，目前正通过基因工程研究，试图克服这一困难——但尚未有一例成功)。但是，某些植物种类，如甘蔗、玉米和大多数重要的杂草，都具有一种代谢途径，可以在其光合细胞中浓缩 CO_2，从而几乎完全防止了光呼吸。含有这种被称为 **C_4 循环**(C_4 cycle)的植物的叶子有特殊的解剖结构，其纤细的叶脉周围密绕着一层**维管束鞘细胞**(bundle-sheath cell)，后者又被一层**叶肉细胞**(mesophyll cell)环绕。

C_4 循环(图 18-26)是 60 年代由 Marshall Hatch 和 Rodger Slack 阐明的。该循环从缺少 RuBP 羧化酶的叶肉细胞开始，吸收环境中的 CO_2，以 HCO_3^- 形式与磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)缩合生成草酰乙酸。草酰乙酸被 NADPH 还原生成苹果酸，苹果酸被转运到维管束鞘细胞中(C_4 即指这些四碳酸)。在鞘细胞中，苹果酸被 $NADP^+$ 氧化脱羧生成 CO_2、丙酮酸和 NADPH。经过这一过程，CO_2 被浓缩并进入卡尔文循环。丙酮酸重新回到叶肉细胞中，在那儿被磷酸化再生 PEP。催化这一反应的酶是**丙酮酸-磷酸二激酶**(pyruvate-phosphate dikinase)，其作用方式比较 559

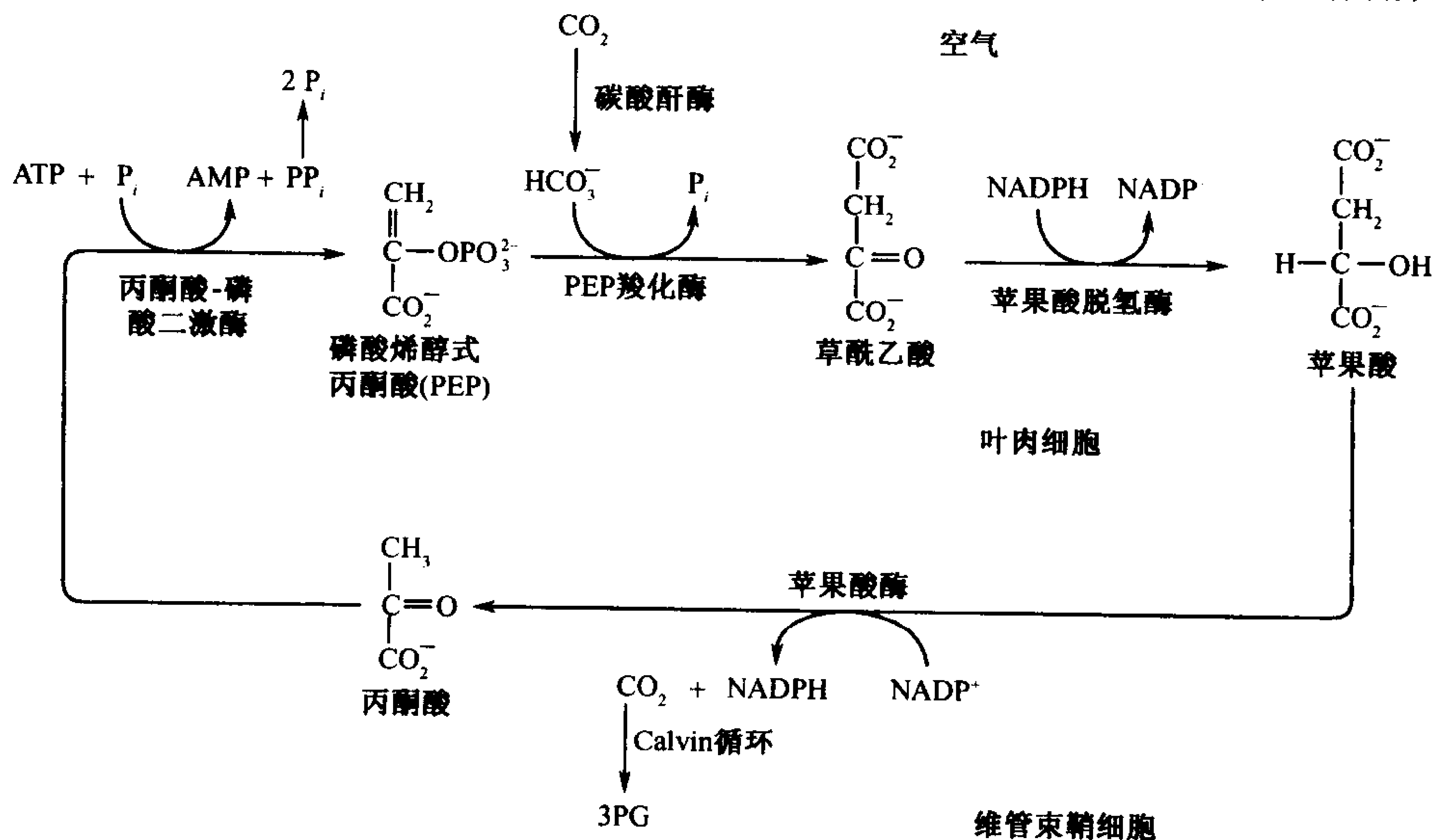


图 18-26 C_4 途径

CO_2 在叶肉细胞中被浓缩并被转运到维管束鞘细胞中进入卡尔文循环。

特殊，通过水解 ATP 生成 AMP + PP_i 而活化了一个磷酸基团。PP_i 进一步水解为 2 个 P_i，相当于消耗了第二个 ATP。因而 CO_2 被浓缩到维管束鞘细胞时，每分子 CO_2 需消耗 2 分子 ATP。所以 C_4 植物中的光合作用每固定一分子 CO_2 总共需消耗 5 分子 ATP，而卡尔文循环本身需消耗 3 分子 ATP。

C_4 植物（C_4 plant）主要生长在热带区域，在炎热、阳光充足的条件下，它们比所谓的 **C_3 植物**（C_3 plant）生长更快（C_3 植物这样命名是因为它们开始时以三碳酸的形式固定 CO_2）。在较凉爽的气候条件下，光呼吸的负担减小，则 C_3 植物具有一定的优势，因为它们固定 CO_2 需要的能量较少。

CAM 植物通过 C_4 循环的变异途径贮存 CO_2

许多生活在沙漠中的肉质植物，存在一条 C_4 循环的变异途径，它将 CO_2 的捕获与卡尔文循环在时间上，而不是空间上分隔开来。如果这些植物像大多数植物一样，在白天打开其气孔（叶子上的小孔）来吸收 CO_2 的话，它们会因为蒸发而失去太多的水分。为了减少这种损失，这些肉质植物只在晚上吸收 CO_2，并利用 C_4 途径的反应（图 18-26）以苹果酸形式贮存 CO_2。这个过程被称为**景天酸代谢**（crassulacean acid metabolism, CAM），所以这样命名是因为这条途径最先是在景天科家族的植物中发现的。贮存一天 CO_2 所需要的大量 PEP 来自淀粉的糖酵解。在白天，苹果酸降解产生 CO_2 和丙酮酸，CO_2 进入卡尔文循环，丙酮酸则用于合成淀粉，因而 CAM 植物可以在水分丢失最少的情况下完成光合作用。

小　结

1. 光合作用是光能驱动 CO_2 的还原产生糖的过程。在植物和蓝细菌中，光合作用氧化水产生 O_2。
2. 在植物中，光合作用机构由包埋在类囊体膜中以及溶解在叶绿体基质中的蛋白质组成。
3. 叶绿素和其他集光色素组成集光复合物，将光能汇集到光合反应中心。
4. 紫色细菌的光合反应中心吸收光子后进行光氧化作用。激发的电子通过一系列电子载体返回反应中心。在电子转移过程中，质子被转位跨过质膜。
5. 在植物和蓝细菌中，光反应系统 I 和 II 以 Z 构架排列，协同作用。PSII 的光氧化作用驱动水的氧化，释放出的电子从 PSII 经细胞色素 b_6f 复合物流向 PSI，并最终到达 $NADP^+$。
6. 电子在 PSI 中的流动，可以是非循环式的，结果导致 $NADP^+$ 的还原；也可以是循环式的，导致额外的质子被转运到类囊体腔中。
7. H_2O 氧化释放出质子以及质子转位进入类囊体腔形成跨膜质子梯度，被 ATP 合成酶用于驱动 ADP 的磷酸化。
8. 暗反应利用光反应产生的 ATP 和 NADPH，从 CO_2 合成糖。在卡尔文循环的第一阶段，CO_2 与核酮糖-1,5-二磷酸（RuBP）反应，最终产生甘油醛-3-磷酸（GAP）。该循环的其余反应再生成 CO_2 的受体 RuBP。
9. 暗反应的关键酶，RuBP 羧化酶，受 pH、[Mg^{2+}] 和抑制物 2-羧基阿拉伯醇-1-磷酸（CA1P）的调控。卡尔文循环的两个二磷酸酶受叶绿体氧还状态的调控，由硫氧还蛋白部分介导的二硫键交换反应进行调控。
10. 光呼吸作用是植物利用光反应产生的 ATP 和 NADPH，消耗 O_2 而产生 CO_2 的过程。C_4 植物通过在其光合细胞中浓缩 CO_2，减小 RuBP 羧化酶的加氧酶活性。CAM 植物利用相关机制保留水分。

参考文献

Barber, J. and Anderson, B., Revealing the blueprint of photosynthesis, *Nature* **370**, 31–34 (1994).

Cramer, W.A., Martinez, S.E., Furbacher, P.N., Huang, D., and Smith, J.L., The cytochrome b_6f complex, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 536–544 (1994).

El-Kabbani, O., Chang, C.-H., Tiede, D., Norris, J., and Schiffer, M., Comparison of reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodopseudomonas viridis:* Overall architecture and protein-pigment interactions, *Biochemistry* **30**, 5361–5369 (1991).

Fromme, P., Structure and function of photosystem I, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6**, 473–484 (1996).

Krauss, N., Schubert, W.-D., Klukas, O., Fromme, P., Witt, H.T., and Saenger, W., Photosystem I at 4 Å resolution represents the first structural model of a joint photosynthetic reaction centre and core antenna system, *Nature Struct. Biol.* **3**, 965–973 (1996).

Nugent, J.H.A., Oxygenic photosynthesis: electron transfer in photosystem I and photosystem II, *Eur. J. Biochem.* **237**, 519–531 (1996). [A useful review of photosynthesis in plants.]

Prince, R.C., Photosynthesis: the Z-scheme revised, *Trends Biochem. Sci.* **21**, 121–122 (1996). [A short summary of $NADP^+$ reduction by PSII in the absence of PSI.]

Schneider, G., Lindqvist, Y., and Brändén, C.-I., RUBISCO: Structure and mechanism, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **21**, 119–143 (1992).

关 键 词

光合作用 photosynthesis
基质 stroma
类囊体 thylakoid
基粒 grana
基质片层 stromal lamellae
天线叶绿素 antenna chlorophyll
集光复合物 LHC
辅助色素 accessory pigments
普朗克定律 Planck′s law
内部转化 internal conversion
荧光 fluorescence
激发子转移 exciton transfer
光氧化(作用) photooxidation
光合反应中心 photosynthetic reaction center
特异配对 special pair
量子产率 quantum yield
光合磷酸化 photophosphorylation
光反应系统 I PSI
光反应系统 II PSII
Z 构架 Z-scheme
卡尔文循环 Calvin cycle
光呼吸 photorespiration
C_4 植物 C_4 plant
C_3 植物 C_3 plant
景天酸代谢 CAM

学习思考题

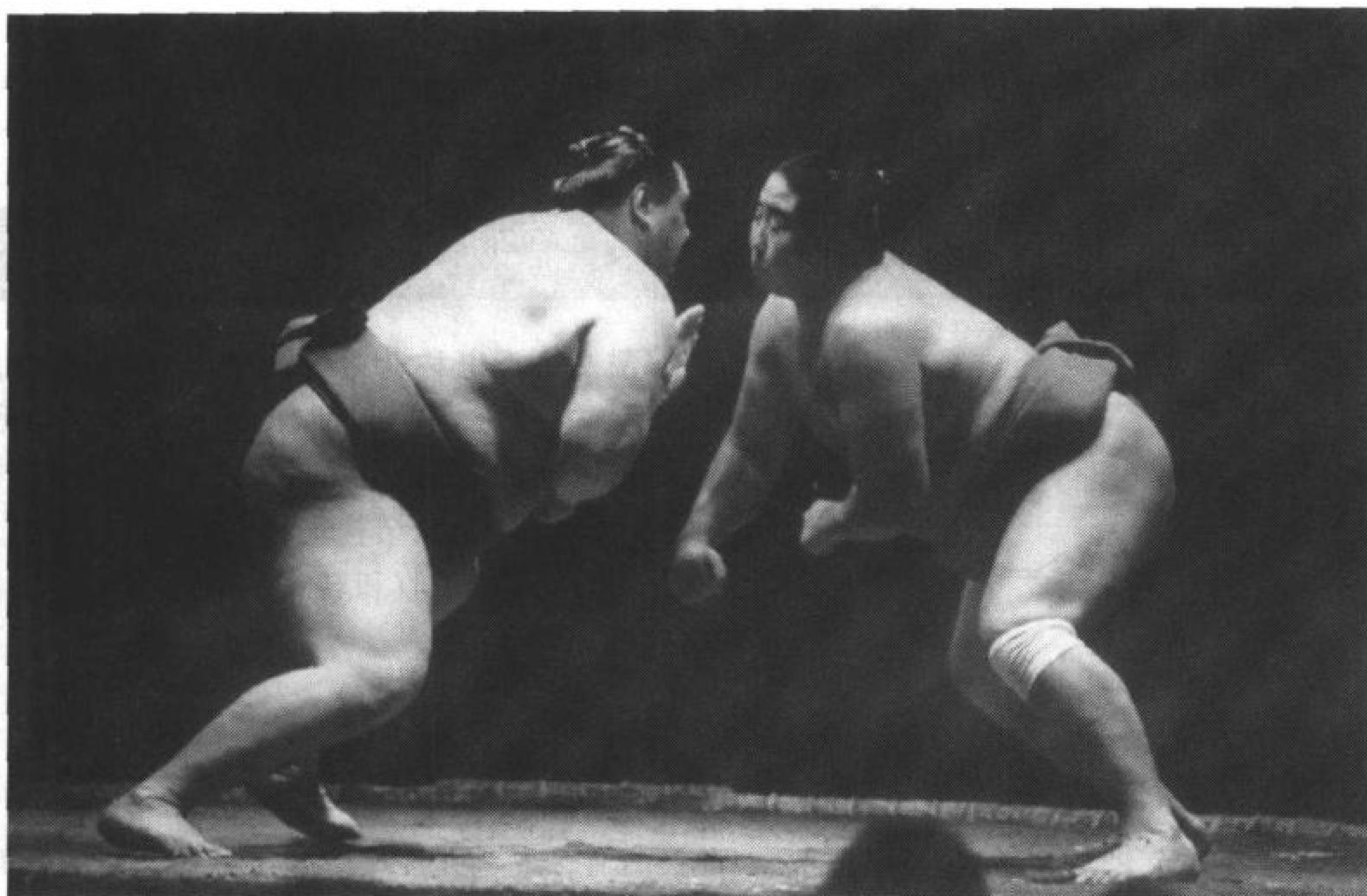
1. 解释光反应和暗反应的相互关系。
2. 为什么说集光复合物很重要?
3. 分子如何消耗吸收的光能?
4. 简述紫色细菌反应中心电子转移的途径。
5. 描述 Z 构架。
6. PSI 中的循环式和非循环式电子转移的意义是什么?
7. 比较光合磷酸化和氧化磷酸化的异同。
8. 总结卡尔文循环的两个阶段。
9. 光合作用如何被调控?
10. 植物如何减小光呼吸?

练 习 题

1. “红潮”是某种藻类大量增殖导致海水变成红色。试述这些藻类中主要的光合色素的光谱特征。
2. 在能进行光合作用的叶绿体悬浮液中加入 $H_2{}^{18}O$。当悬浮液接受光照后同位素标记将出现在什么地方?
3. (a) 计算一摩尔红光($\lambda = 700nm$)的光子的能量。
   (b) 利用这些能量理论上可以合成多少摩尔 ATP?
4. (a) 计算植物中光反应的 $\Delta\varepsilon^{o\prime}$ 和 $\Delta G^{o\prime}$,即 $NADP^+$ 对 H_2O 的 4 电子氧化。
   (b) 利用问题 18-3 的答案,计算驱动这一过程理论上需要多少摩尔的红光($\lambda = 700nm$)光子。
   (c) 需要多少 mol UV 光($\lambda = 220nm$)的光子?
5. 比较细菌光合作用中心和真核细胞 PSI 之间功能上的相似性。
6. 为什么叶绿体每放出一分子 O_2 可以吸收超过 8～10 个光子?
7. 氧分压增加对光合作用的暗反应会有什么影响?
8. 叶绿体接受光照直到卡尔文循环的中间产物水平达到恒态,关闭光源,在这之后 RuBP 和 3PG 的浓度如何变化?
9. 计算卡尔文循环结合糖酵解和氧化磷酸化的能耗,亦即从 CO_2 合成淀粉,以及光合作用产生 ATP 和 NADPH 所消耗的能量与淀粉完全氧化所产生的能量之比。假设每分子 NADPH 在能量上相当于 3 分子 ATP,并假设淀粉的生物合成与降解机制与糖原合成与降解机制相同。
10. 解释沙漠中某些植物的叶子,在清晨有些酸味,但随着白天的消逝,它们就变得无味,然后又有些苦味。

(南京大学　郑伟娟　译)

第19章 脂类代谢



储存的脂肪能够作为代谢燃料用于氧化反应。(引自 Chris Cole/All sport)

大多数细胞含有各种各样的脂类,但这些结构各异的分子多数具有相似的功能,例如,多数

细胞能够容忍它们的膜脂组成的改变，以保证膜具有流动性，流动性是膜组分中脂肪酸链的一个重要性质(节 9-2B)。

而作为细胞组分的贮存能量的脂类则展现出更大的多样性，三酰甘油库建立后又随着改变的生理需要而逐渐消耗，骆驼的驼峰就是一个熟知的脂肪库的例子，它可以提供数天乃至几周内所需的能量和代谢用水。冬眠的哺乳动物和那些因长距离迁移而没有补充能量的候鸟，体内脂肪含量也有很大变化。这些情况下脂代谢值得注意的是，少量物质通过几种相对简单的生物合成和降解途径完成。

这一章中我们将介绍能量代谢中脂的主要功能，首先阐述脂肪酸的吸收、转运和氧化产能，然后阐述脂肪酸和其他脂类，包括甘油磷脂、鞘脂和胆固醇的合成。

1. 脂的消化、吸收和转运

1-棕榈酰-2,3-二油酰甘油

三酰甘油(也称为脂肪或甘油三酯)组成约 90%的食用脂，是人类代谢能量贮备的主要形式。三酰甘油是棕榈酸和油酸的甘油三酯。一些生物常见的脂肪酸的名称和结构见表 9-1。三酰甘油从小肠到组织的消化、吸收和转运的机理必须符合它们内在的疏水性。

A. 消化和吸收

因为三酰甘油是水不溶性的，而消化酶是水溶性的，三酰甘油的消化是在脂水界面进行。因此三酰甘油的消化速率取决于脂水界面的表面积，而这个面积可以因小肠的蠕动及**胆汁酸**(bile acid)的乳化作用大大增加。胆汁酸[也称**胆盐**(bile salt)]是类似去污剂的亲水脂分子，它可以溶解脂微粒。胆汁酸是胆固醇的衍生物，它由肝脏合成并且以与甘氨酸或**牛磺酸**(taurine)结合的形式(图 19-1)分泌至胆囊贮存。然后再从那里分泌至小肠，即脂类消化和吸收的场所。

	R_1=OH	R_1=H
R_2 = H	胆酸	鹅脱氧胆酸
R_2 = NH—CH_2—COOH	甘氨胆酸	羟鹅脱氧胆酸
R_2 = NH—CH_2—CH_2—SO_3H	牛磺胆酸	牛磺脱氧胆酸

图 19-1 主要胆汁酸的结构和它们的甘氨酸、牛磺酸结合物

脂酶在脂水界面发生作用

胰脂肪酶(lipase, **三酰甘油脂酶**)催化三酰甘油的 1 位和 3 位水解,相继形成 **1,2-二酰甘油**和 **2-酰基甘油**,以及脂肪酸的钠盐和钾盐(肥皂)。胰脂肪酶的活性在其接触到脂水界面时大大增加,这种现象称为**界面激活**(interfacial activation)。在与脂水界面接合的过程中需要胰**辅脂肪酶**(colipase)的参与,它是一个含 90 个氨基酸残基的蛋白质,与脂酶以 1:1 比例形成复合物。由 Christian 和 Cambillau 测得的胰脂肪酶-辅脂肪酶复合物的 X 射线衍射图谱揭示了脂酶的界面激活和辅脂肪酶帮助脂酶结合到脂水界面的结构基础(图 19-2)。

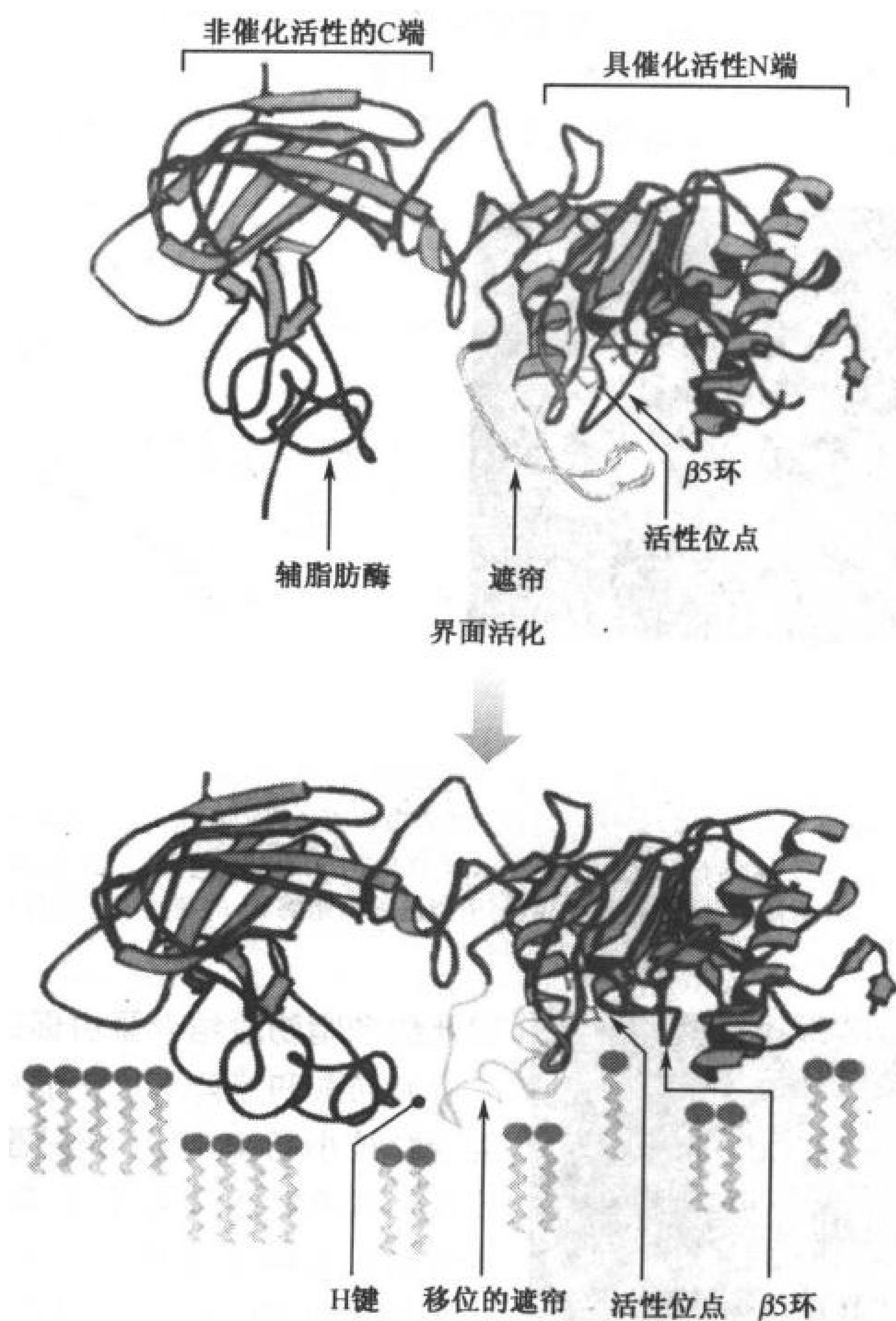


图 19-2　三酰甘油脂酶界面激活的机制

三酰甘油脂酶与辅脂肪酶原(辅脂肪酶的前体,紫色)组成复合体。当与磷脂分子微团(绿色)结合时覆盖住酶的活性位点(棕褐色)的 25 残基"遮帘"(黄色)改变构象,暴露其疏水基团,解除了活性位点的覆盖。这使得 10 个残基的 β5 环(褐色)移动到旁边,以形成酶的氧阴离子穴。辅脂肪酶原也改变其构象,并与开启的"遮帘"形成氢键,使之稳定于这样的构象,而与脂肪酶一起形成了伸展的疏水面。[引自 Nature 362,793(1993)]

含 449 个残基的胰脂肪酶的活化位点位于酶的 N 末端区域(1～336 残基),它含有一个与丝氨酸蛋白酶非常相似的催化三聚体(节 11-5B;也可以说脂的水解作用和肽的水解作用在机制上是相似的)。在没有脂微粒时,脂酶的活化位点被一个含 25 个残基的螺旋"盖"包住,然而当脂微

粒存在时，螺旋盖经历一个复杂的结构重组而将活化位点暴露出来。同时一个由 10 个残基组成的环(β5 环)，通过构象变化形成活化酶的氧阴离子洞，并在靠近活化位点的入口处产生一个疏水界面。

辅脂肪酶与脂酶的 C 末端区域(337～449 残基)结合，它的三个环状的疏水末端从复合物中延伸出去。由此产生一个连续的疏水平台，延伸经过脂酶的活化位点的部位大于 50 Å，而这可能有助于复合物与脂表面的结合，辅脂肪酶亦与打开的盖形成 3 个氢键以稳定其构象。

其他的脂酶，如磷脂酶 A_2(图 9-6)，亦趋向于在界面催化反应，不同的是它不改变其构象，而是含有一个疏水通道，以便使底物可以从磷脂聚合体(微球体或膜)表面直接与酶的活化部位结合(图 19-3)。因而在从离开微球体到与酶结合的过程中，底物不需要溶剂化及之后的脱溶剂化。与此相对的是，可溶的和分散的磷脂则必须首先克服这些巨大的热力学障碍才能与酶结合。

565

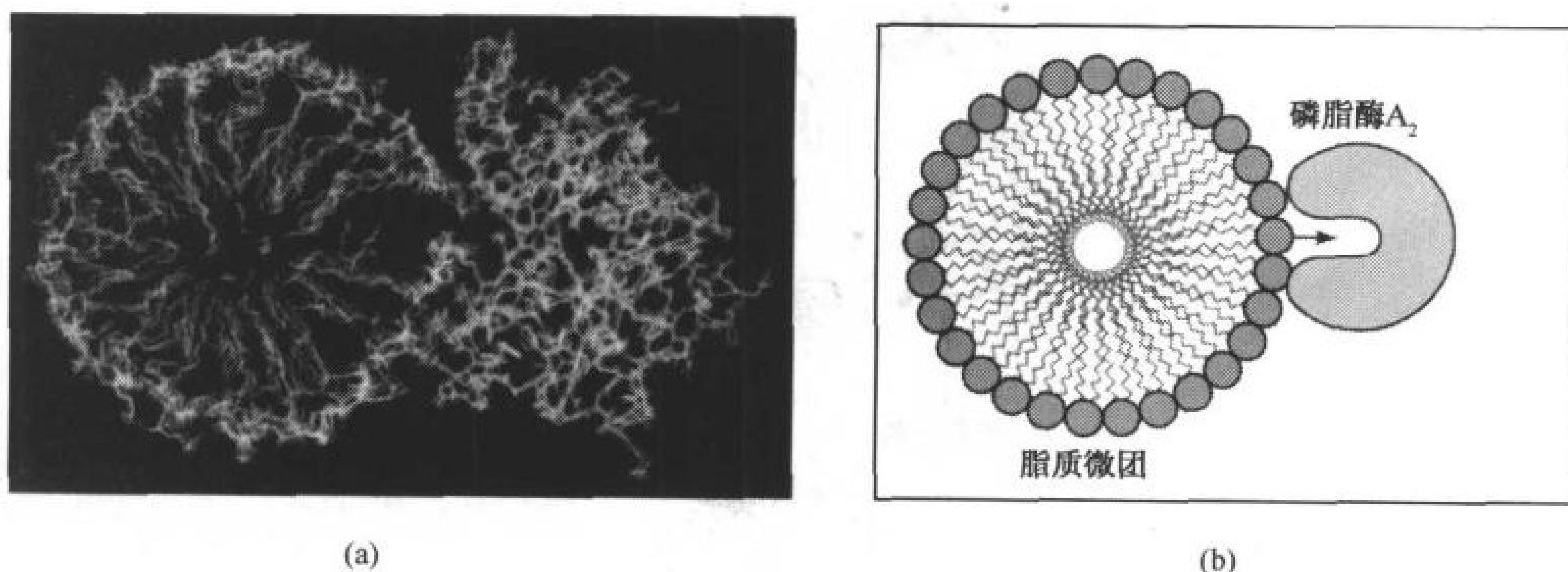


图 19-3 结合于磷脂酶 A_2 的底物

(a)磷脂酶 A_2 与溶血磷脂酰乙醇胺分子团复合物假设模型的横截面。蛋白质为青色，磷脂头部为黄色，蓝色为烃基尾部。通过一系列每隔 5ps 一幅的超迭加图像显示计算出的复合物组装的原子的运动。(引自 Raymond Salemme, E. I du pont de Nemours & Company) (b) 微团磷脂进入磷脂酶 A_2 的疏水磷脂通道(红色箭头)的示意图。

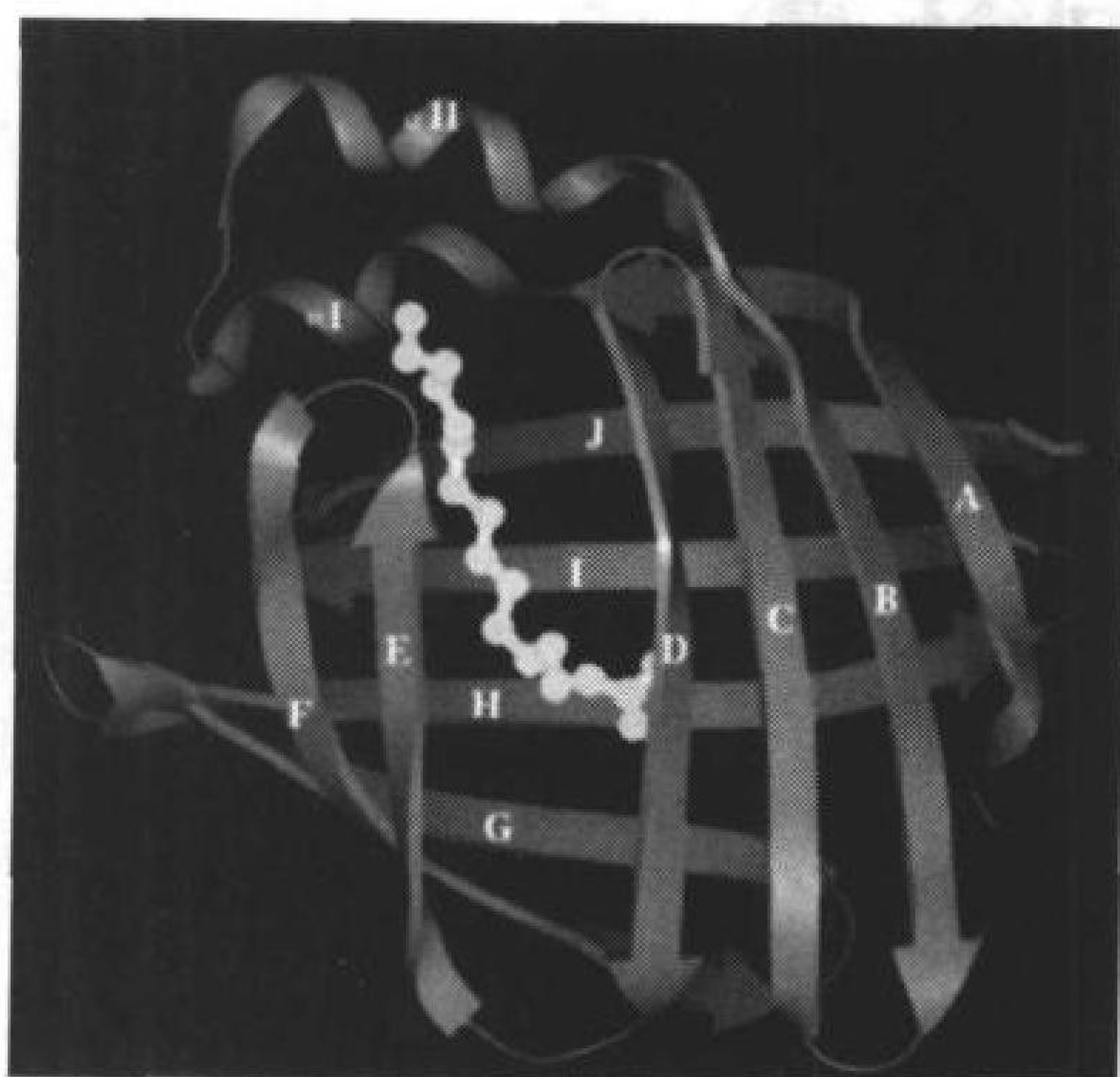


图 19-4 X 射线衍射得到的大鼠小肠脂肪酸结合蛋白的结构

蓝色条带结构为蛋白质，黄色球-棍结构为棕榈酸盐。

(引自 James Sacchettini, Texas A&M University.)

566

胆汁酸和脂肪酸结合蛋白促进小肠吸收脂肪

脂肪酸和脂降解产生的单酰甘油、二酰甘油的混合物被小肠细胞[**小肠黏膜**(mucosa)]吸收。*胆汁酸不仅有助于脂类消化，而且对于脂的降解产物的吸收也是极其重要的。*由胆汁酸形成的微粒吸收非极性的脂降解物并运送它们通过小肠壁的固定结合水层。这个过程的重要性可以由胆管堵塞的患者证实：他们只能吸收少量的脂降解物，大部分都被水解掉形成粪便。胆汁酸对于小肠有效地吸收脂溶性维生素 A、D、E、K 同样是必需的。

在小肠细胞中，脂肪酸与**小肠脂肪酸结合蛋白**(I-FABP)形成复合物，这种胞质蛋白可以提高这些水不溶性底物的有效溶解性，而且还可以使细胞免受它们的类去污剂效应的影响。由 James Sacchettini 测定的鼠 I-FABP 的 X 射线结构表明这个

由 131 个残基组成的单亚基蛋白主要由 10 条反平行 β 链堆积成两个近似垂直相交的 β 折叠片(图 19-4)，一个脂肪酸分子位于其中两条 β 链构成的裂隙中，并大致与该 β 链平行(这种结构称之为"β 夹")，脂肪酸的羧基与 Arg 106、Gln 115 和两个结合水分子相互作用，而它的尾端则被一些疏水部位，主要是芳香族残基的侧链包裹。

B. 脂的转运

被小肠黏膜吸收的脂降解产物脂肪酸被转化成三酰甘油再包装成脂蛋白颗粒——**乳糜微粒**(chylomicron)，这些微粒释放进入小肠淋巴细胞，穿过淋巴器官再排入大的体静脉，通过血液将乳糜微粒送至其他组织。

其他的脂蛋白(结构如节 10-3A 所示)由肝脏合成。尽管各种脂蛋白的生理作用不同，但它们都具有将水不溶性的脂成分稳定于水溶液中的功能。

乳糜微粒在外周组织的毛细血管中脱脂化

含有外源(食物)三酰甘油和固醇的乳糜微粒，吸附在骨胳肌和脂肪组织毛细血管的内表面。乳糜微粒的三酰甘油组分被胞外**脂蛋白脂酶**(lipoprotein lipase)水解，组织再将水解产物单酰甘油和脂肪酸重吸收，乳糜微粒因三酰甘油不断被水解而形成富含胆固醇的**乳糜微粒残体**(chy-

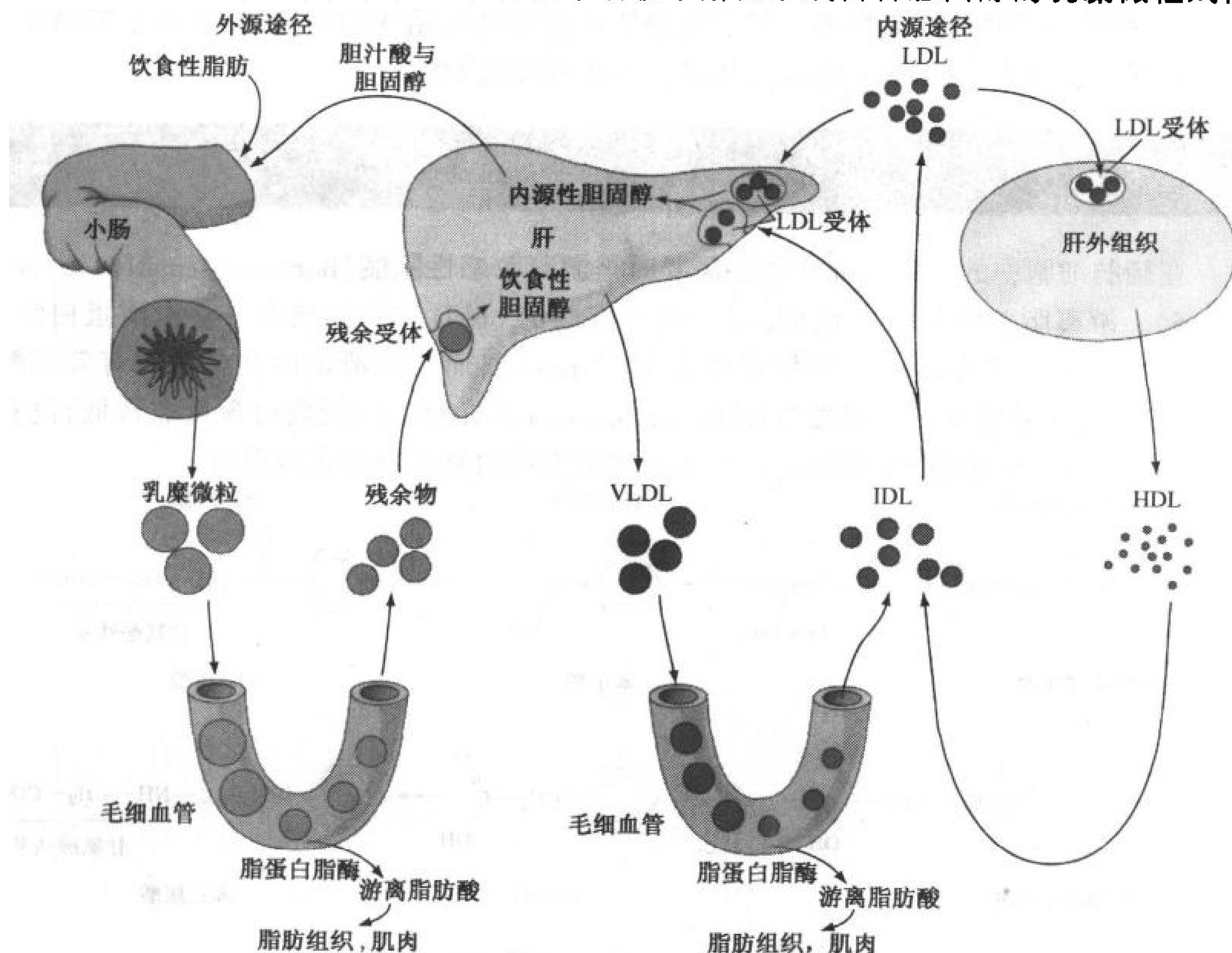


图 19-5　人血浆三酰甘油和胆固醇运输的模型

[引自 Brown, M.S. and Goldstein, J.L., in Brunwald, E., Issebacher, K.J., Petersdorf, R.G., Wilson, J.D., Martin, J.B., and Fauci, A.S. (Eds.), Harrison's Principles of Internal Medicine (11th ed.), p.1652, McGraw Hill (1987)]

lomicron remnant)。残体从毛细血管内壁分泌重新进入血液循环再被肝脏吸收。所以乳糜微粒将食物中的三酰甘油运送到肌肉和脂肪组织，将胆固醇运送到肝脏(图 19-5 左)。

VLDL 被逐步降解

极低密度脂蛋白(VLDL)是在肝脏里合成的，转运内源的三酰甘油和胆固醇，它在脂肪组织和肌肉组织的毛细血管中被脂蛋白脂酶降解(图 19-5 右)。释放的脂肪酸被细胞吸收作为氧化能源或用于重新合成三酰甘油。三酰甘油的甘油骨架被转运至肝脏或肾脏，转化为甘油中间代谢物二羟丙酮磷酸。然而，这个三碳单体氧化产生的能量仅是三酰甘油三条脂酰链氧化提供能量的一小部分。

567 VLDL 释放三酰甘油后，自身也丢失了一些载脂蛋白(节 10-3A)，首先成为**中密度脂蛋白**(IDL)参与循环，然后再转化为**低密度脂蛋白**(LDL)。大约一半的 VLDL 被降解为 IDL 和 LDL，然后通过受体介导的内吞作用被肝脏吸收(节 10-3B)。

HDL 将乳糜微粒从组织运送至肝脏

高密度脂蛋白(HDL)具有与 LDL 完全相反的功能：它们从组织中去除胆固醇。HDL 由大量来自于其他脂蛋白的降解物在细胞质中装配而成。随血液循环的 HDL 可能是从细胞质膜中获取胆固醇，并将其转化为胆固醇酯。然后再将胆固醇酯转送给 VLDL，这个过程了解得很少。有迹象表明肝脏是通过一种特异 HDL 受体的介导直接吸收 HDL。

568

2. 脂肪酸的氧化

贮存在脂肪细胞中的三酰甘油在代谢需要时被**激素敏感性脂酶**(hormone-sensitive lipase)动员(节 19-5)。游离脂肪酸释放入血液，与一种可溶性的 66kD 单亚基蛋白——血清蛋白结合。如果没有血清蛋白，脂肪酸的最大溶解度约为 10^{-6} mol/L；而与血清蛋白结合后的有效溶解度可达到 2 mmol/L。然而患有**无清蛋白血症**(analbuminemia)的病人(清蛋白含量非常低)没有明显的不适症状；很显然他们的脂肪酸是以与其他血清蛋白的复合物形式运送的。

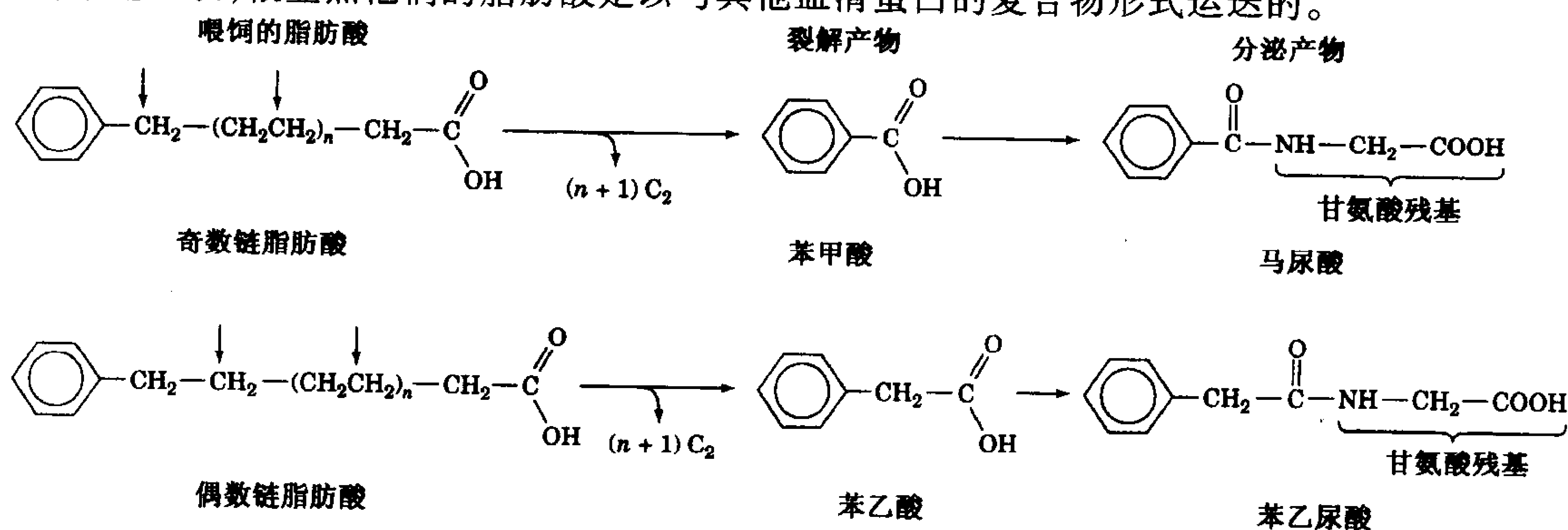


图 19-6 Franz Knoop 经典实验

结果表明脂肪酸的代谢氧化发生在 β 碳原子上。在 ω-苯环标记的含奇数碳原子的脂肪酸被氧化成为苯环标记的 C_1 产物苯甲酸；而含有偶数碳原子的脂肪酸被氧化后产物是苯环标记的 C_2 产物苯乙酸。这些产物形成各自的甘氨酰胺(马尿酸和苯乙尿酸)排泄出去。垂直箭头表示演绎出的碳原子氧化位点。C_2 中间产物被氧化成为 CO_2 和 H_2O，而无法分离到。

远在脂肪酸氧化酶被纯化以前，脂肪酸氧化的过程就为人们所认识。在 1904 年，Franz Knoop 首次用化学标记来示踪代谢途径，它用 ω(最后一个)碳原子被苯环标记的脂肪酸喂狗再从它们的尿中分离含苯基的代谢物。饲以用苯基标记的含奇数碳原子的脂肪酸，尿中排出的是**苯甲酸**(benzoic acid)的甘氨酰胺衍生物**马尿酸**(hippuric acid)，而饲以用苯基标记的含偶数碳原子的脂肪酸，尿中排出的是**苯乙酸**(phenylacetic acid)的甘氨酰胺衍生物**苯乙尿酸**(phenylaceturic acid)(图 19-6)。Knoop 据此推断脂肪酸是以二碳单元逐步降解，并且认为该过程包括羧基端的 β 碳原子的氧化。否则，苯乙酸会进一步氧化成苯甲酸。Knoop 的 **β 氧化**(β oxidation)学说最终于 50 年代被证实，β 氧化途径是一系列的不断反复去除二碳单元的酶促过程。

A. 脂肪酸的活化

脂肪酸氧化前，它们必须通过一个 ATP-依赖性酰化反应"初始化"为脂酰 CoA。活化过程由一个至少包含三种**酰基 CoA 合成酶**(也称**硫激酶**)的家族催化，这三种酶有不同的链长特异性。它们位于内质网或线粒体外膜上，都催化反应：



$$脂肪酸 + CoA + ATP \rightleftharpoons 脂酰\ CoA + AMP + PP_i$$

这个反应是由 CoA 的巯基攻击酐化中间体脂酰腺苷酸，形成硫酯产物(图 19-7)，并将 ATP 水解释放的自由能储存于高能硫酯键中(节 13-2D)。总的反应是由无机焦磷酸酶催化焦磷酸水解释放大量能量驱动完成。

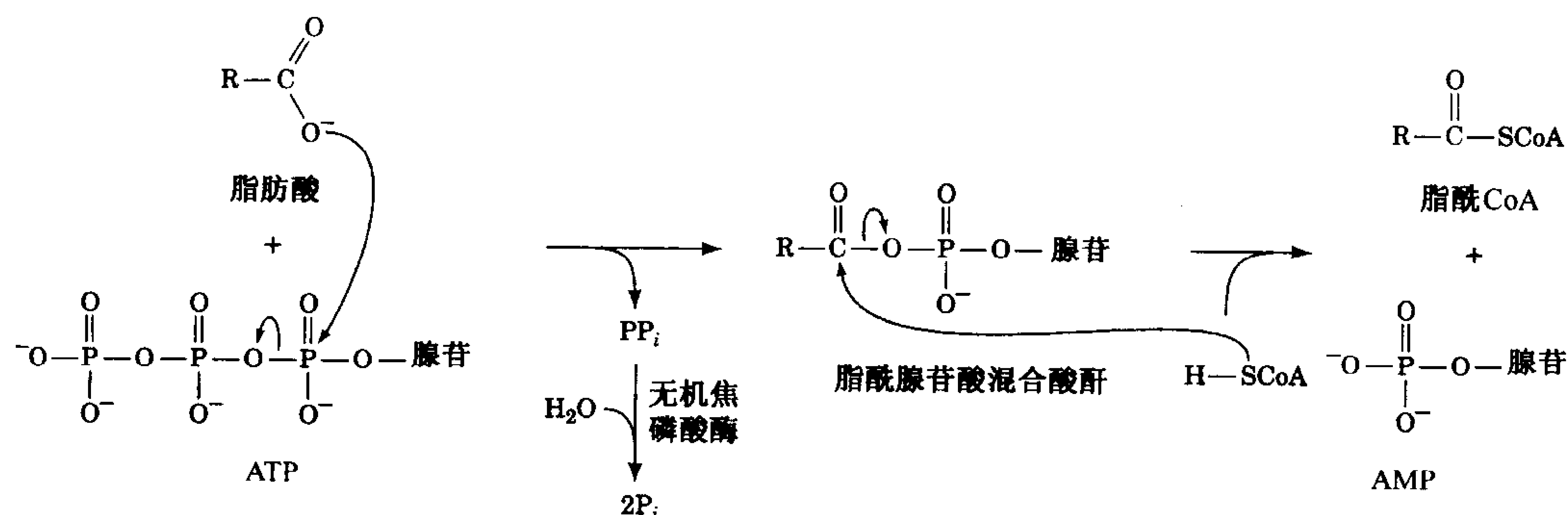
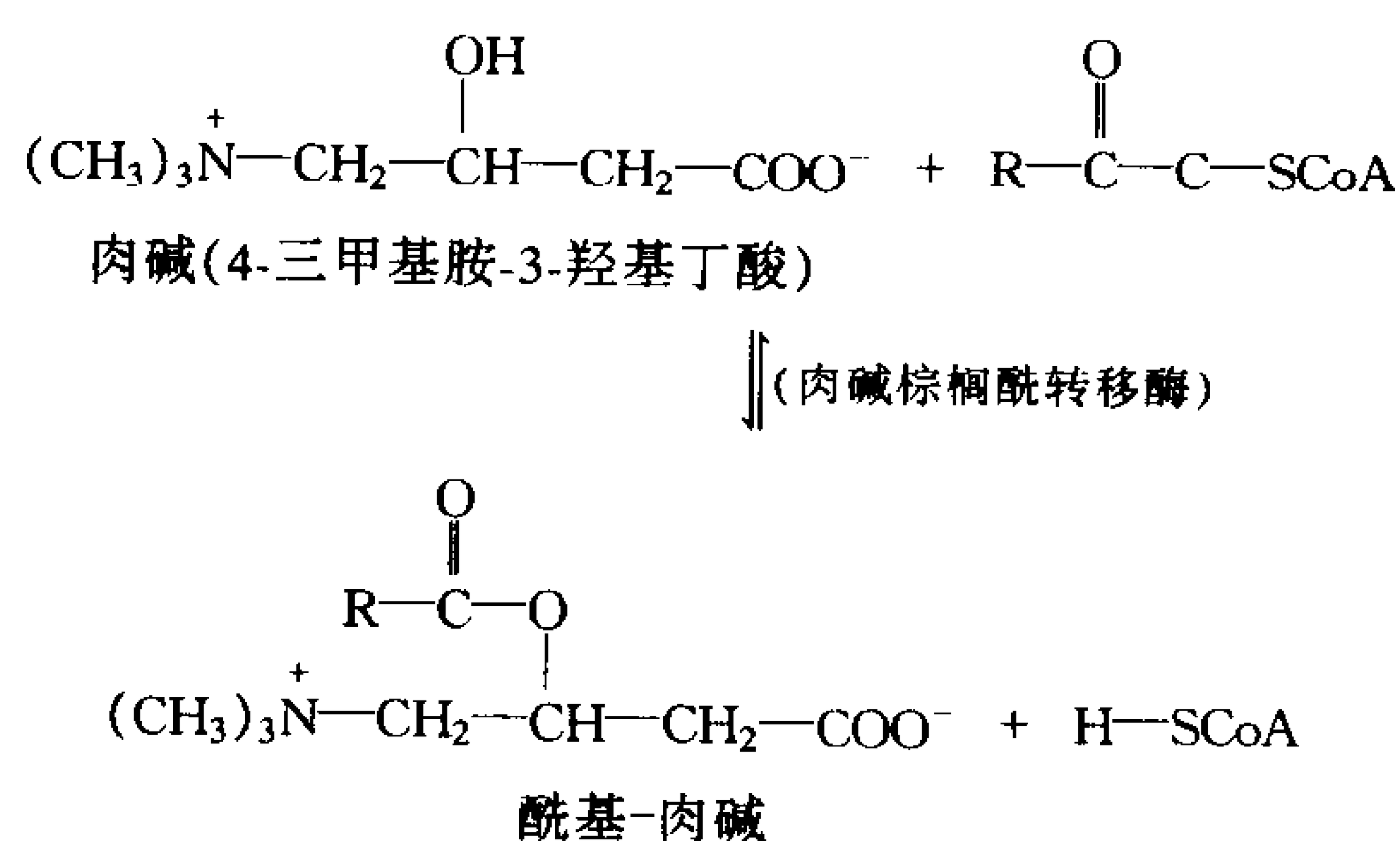


图 19-7 脂酰 CoA 合成酶催化下的脂肪酸的活化机制
脂酰 CoA 的合成涉及形成一个脂酰腺苷酸混合酸酐中间体。

B. 转运穿过线粒体膜

尽管脂肪酸氧化前的活化发生在细胞质中，它的氧化过程却是在线粒体中进行，这是由 Eugene Kennedy 和 Albert Lehninger 于 1950 年确定的。因此我们必须考虑脂酰 CoA 是如何透过线粒体内膜的。长链脂酰 CoA 不能直接透过线粒体内膜。事实上，它的酰基部分首先转到**肉碱**(carnitine)上，肉碱是一种动植物组织中都存在的化合物。



这个转酰基反应平衡常数约为 1,表明**酰基肉碱**(acyl-carnitine)的 *O* 酰基键水解的自由能与酰基 CoA 的硫酯键水解的自由能相似。**肉碱棕榈酰转移酶I** 和II 可以转运各种酰基基团(不仅是棕

570

榈酰基),它们分别位于线粒体内膜的内、外表面。转送过程由一种特异的载体蛋白调节,它将酰基-肉碱运入线粒体而将游离肉碱转运出去。这一酰基 CoA 转运系统见图 19-8。

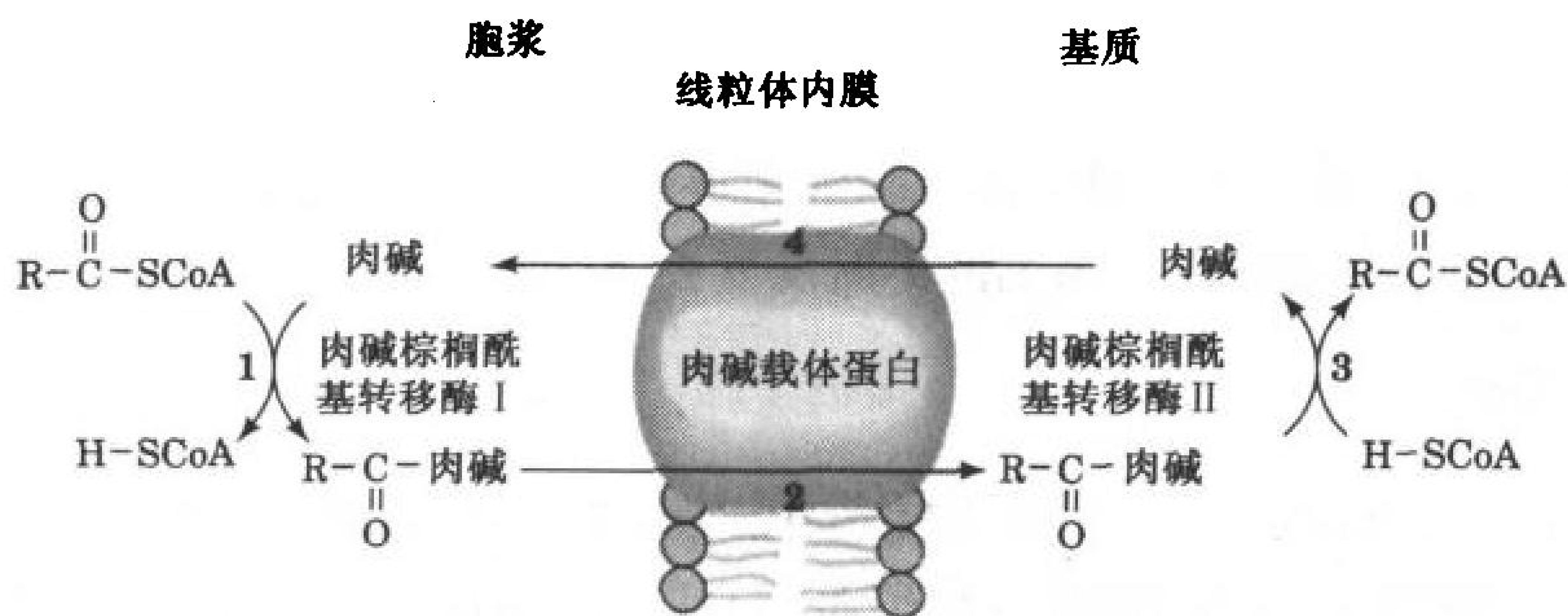


图 19-8 脂肪酸向线粒体内的运输

(1)细胞质中的酰基 CoA 的酰基基团被转移到肉碱上,而释放 CoA 到细胞质中。(2)产生的酰基-肉碱通过转运蛋白进入到线粒体基质中。(3)脂酰基转移到线粒体基质中的 CoA 上。(4)产生的肉碱返回到细胞质中。

C. β 氧化

脂酰 CoA 的 β 氧化降解是通过四步反应进行(图 19-9):

1) 由黄素蛋白**脂酰 CoA 脱氢酶**催化脱氢反应形成反式 α、β 双键;
2) **烯脂酰 CoA 水化酶**催化水化反应形成 **3-L-羟脂酰 CoA;**
3) **3-L-羟脂酰 CoA 脱氢酶**催化 β-羟脂酰 CoA 进行 NAD^+-依赖性脱氢反应形成 β-酮脂酰 CoA;
4) 由 **β-酮脂酰 CoA 硫解酶**(简称**硫解酶**)催化与 CoA 的硫解反应使 C_α—C_β 断裂形成乙酰-CoA 和一个新的比原来少两个碳原子的脂酰 CoA。

脂酰-CoA 脱氢酶与电子传递链相连接

线粒体含有三种脂酰 CoA 脱氢酶,分别对短(C_4~C_6)、中(C_4~C_{12})、长(C_8~C_{20})链的脂酰-CoA 具有不同专一性。这些酶催化的反应包括 C_α 上一个质子的去除及 C_β 上等量的氢离子转移至 FAD 中(图 19-9,反应 1)。**中链脂酰 CoA 脱氢酶**与**辛酰 CoA** 形成的复合物的 X 射线结构已由 Jung-Jakim 揭示,它清楚地表明酶是如何为反应定向排列碱性基团(Glu 376)、底物 C_α—C_β 键和 FAD 辅基的(图 19-10)。

脂酰 CoA 底物氧化过程中产生的 $FADH_2$ 在线粒体的电子传递链中通过一系列电子传递反

572

应重新被氧化。**电子传递黄素蛋白**(ETF)将一对电子从 $FADH_2$ 传递给黄素-铁-硫蛋白 **ETF:泛醌氧化还原酶**(ETF:ubiquinone oxidoreductase),反过来它又通过还原型辅酶 Q(CoQ)将一对电子转运回线粒体电子传递链(图 19-9,5~8 步反应)。从 CoQ 阶段开始的电子传递链反应将 O_2 还原成 H_2O,同时每传递一对电子合成 2ATP(节 17-3C)。

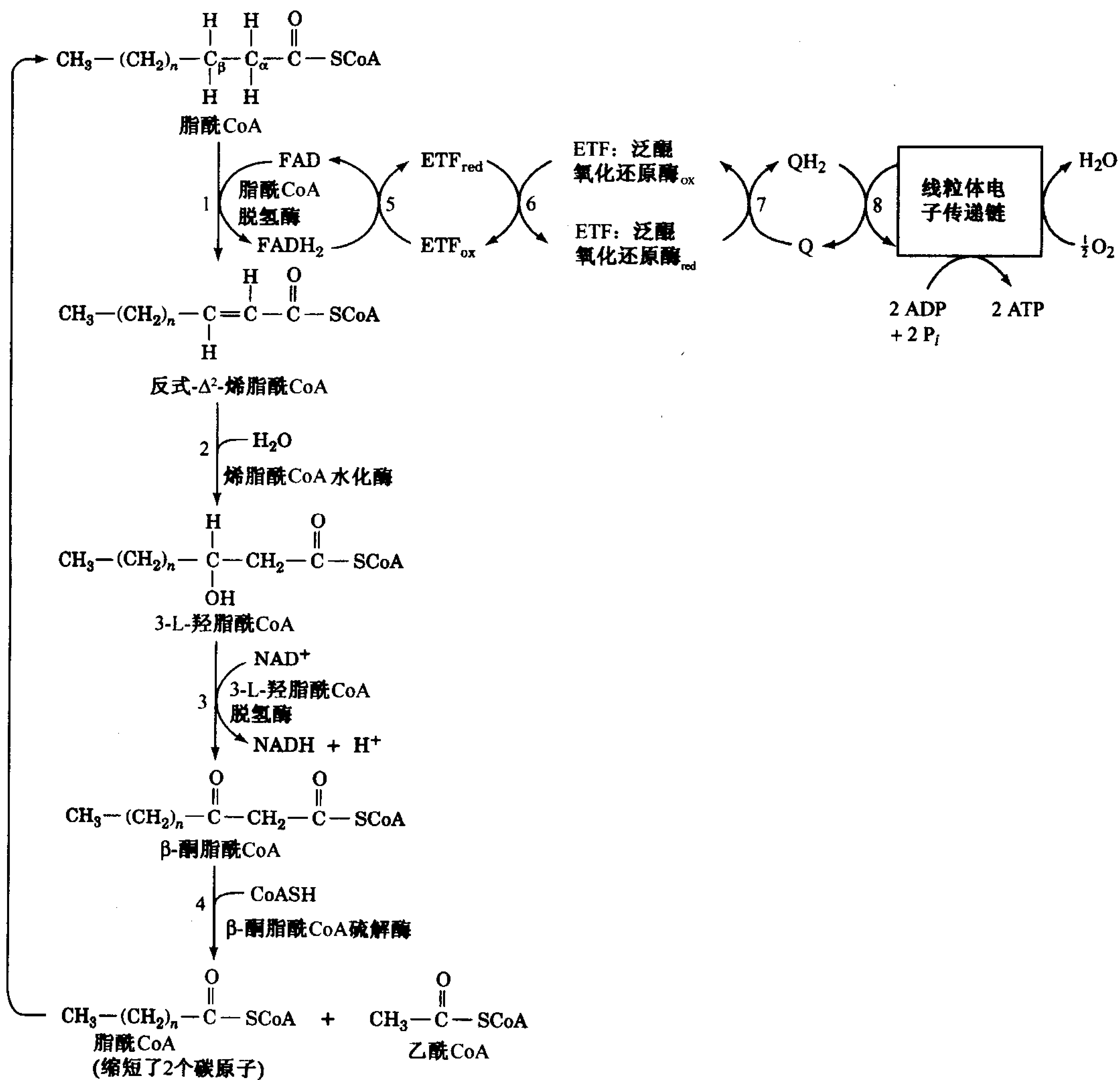


图 19-9 代谢的秘诀：脂酰 CoA 的 β 氧化途径

硫解酶反应沿 Claisen 酯解途径发生

β 氧化的第四步是硫解酶反应(图 19-9，反应 4)，产生乙酰 CoA 及一个比原来少两个碳原子的新的脂酰 CoA(图 19-11)。

573

1) 酶活性部位的巯基结合到底物脂酰 CoA 的 β-酮基上。

2) 碳碳键断裂，底物脂酰 CoA 与活性部位的巯基连接产生一个硫酯，及一分子乙酰 CoA 负碳离子中间体，该中间体将电子移至硫酯的羰基而保持稳定，这类反应被称为 Claisen 酯解(Claisen 聚合的逆反应)。在柠檬酸循环中，柠檬酸合酶也催化一个含有稳定的乙酰-CoA 负碳离子中间体的反应(节 16-3A)。

3) 酶的一个酸性基团使乙酰 CoA 负碳离子质子化，生成乙酰 CoA。

4)和5) 最后，CoA 代替酶-硫酯中间体的酶巯基生成一个少两个碳原子的脂酰 CoA。

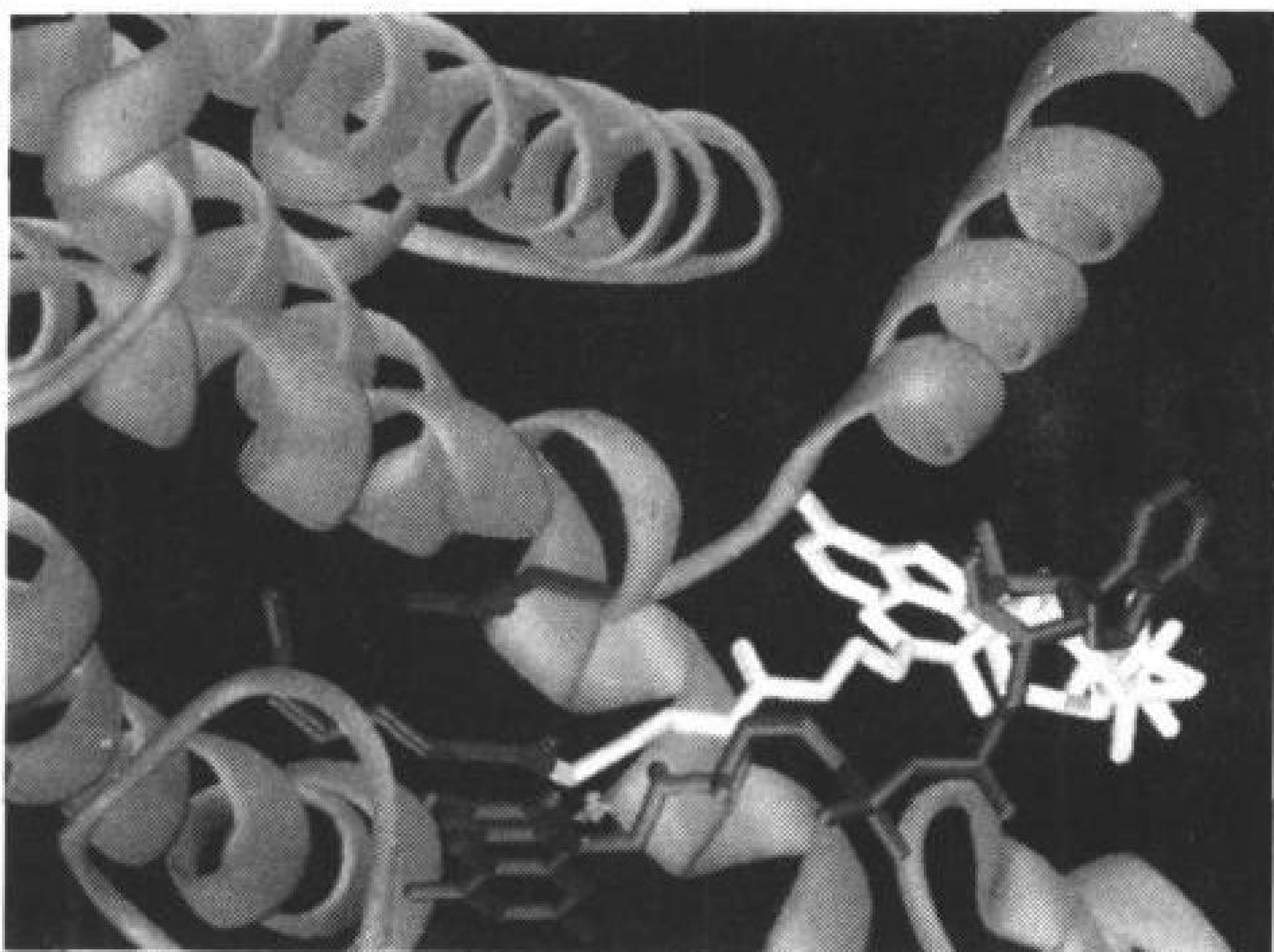


图 19-10 中链脂酰 CoA 脱氢酶活性部位的带状图

从猪肝线粒体中提取的脂酰 CoA 脱氢酶是由 4 个相同的含有 385 个残基的亚基组成的四聚体。每一个亚基以充分展开的构象结合一个 FAD 辅基和一个辛酰 CoA 底物(其辛酰基和 CoA 主体部分分别为蓝色和白色)。辛酰 CoA 的 C_α—C_β 键夹在 Glu 376 的羧基(红色)和黄素环(绿色)之间,辛酰 CoA 这样的结合符合下面的假设,即在由酶催化的 α,β 脱水反应中,Glu 376 是摄取 α 质子的碱性基团。

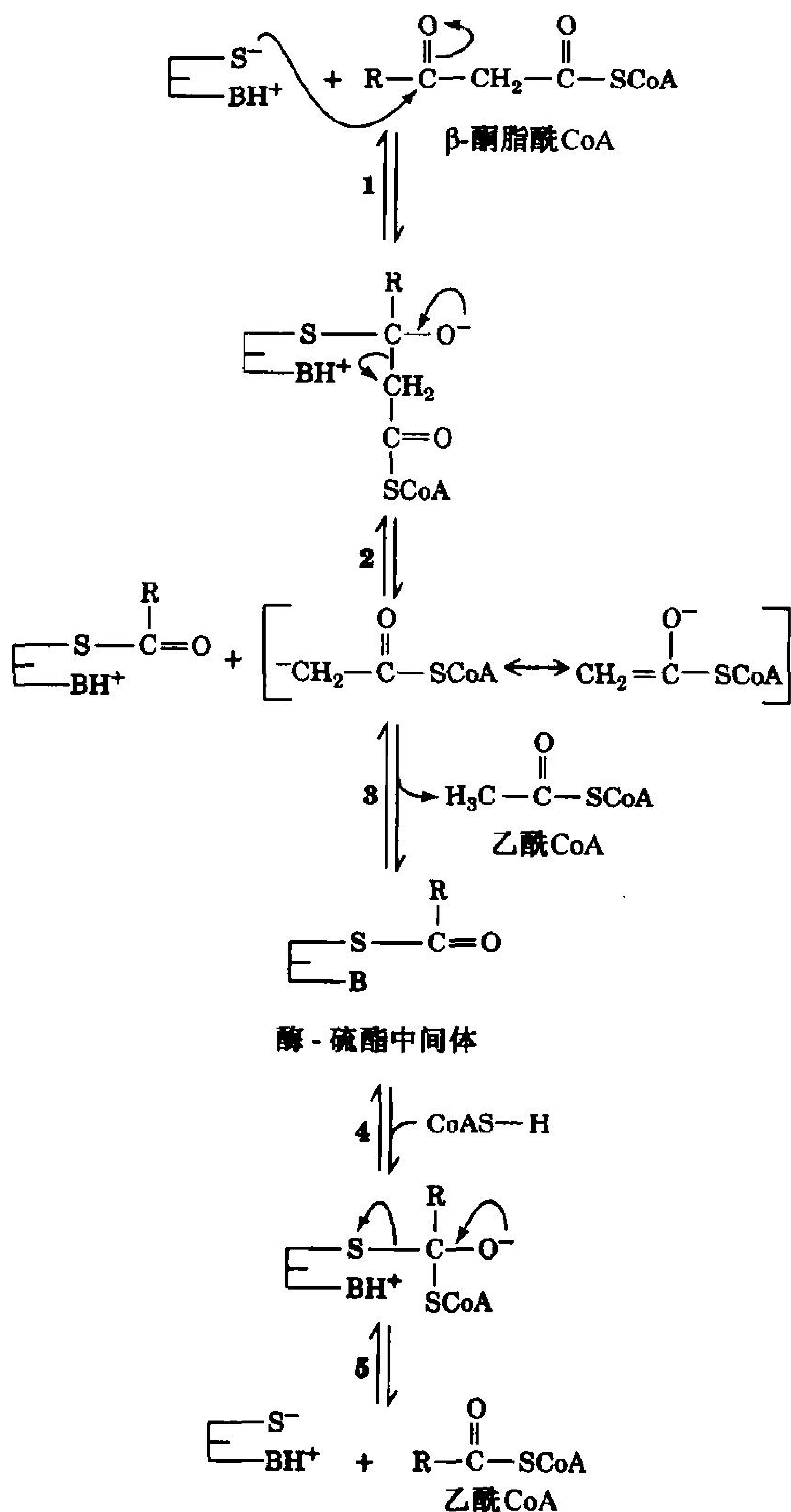


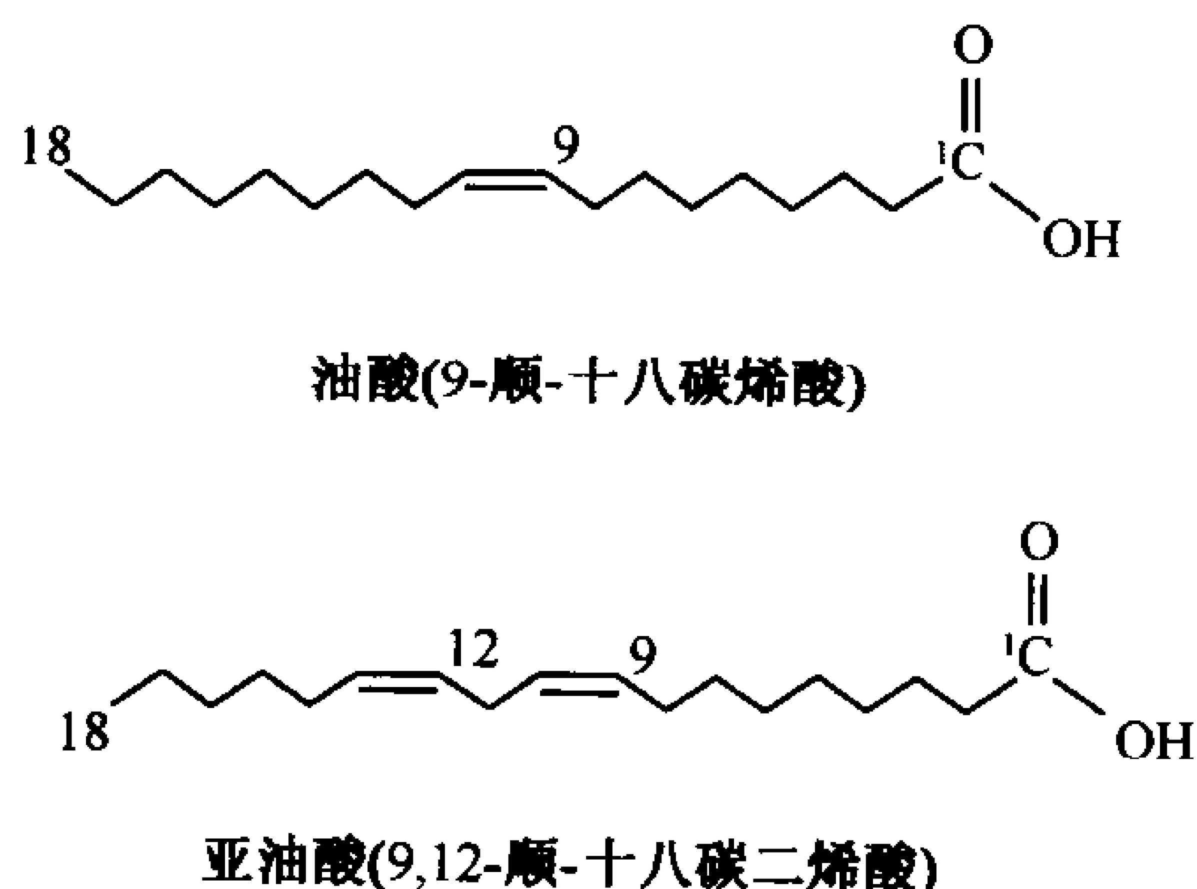
图 19-11 β-酮脂酰 CoA 硫解酶的作用机理

活性部位半胱氨酸残基参与酶-硫酯中间产物的形成。

脂肪酸氧化是高效的放能反应

脂肪酸氧化的功能当然是产生代谢能量。每一轮β氧化产生1个NADH,1个$FADH_2$和1个乙酰CoA分子。乙酰CoA通过柠檬酸循环又可产生1个$FADH_2$和3个NDAH,它们通过氧化磷酸化再氧化形成ATP。脂肪酸分子的彻底氧化是一个产生大量ATP的放能反应。例如,棕榈酰CoA(含有C_{16}脂酰基)的氧化包括7轮β氧化,产生7个$FADH_2$、7个NADH和8个乙酰CoA,8个乙酰CoA的氧化进而又产生8个GTP、24个NADH和8个$FADH_2$。因为31个NADH分子氧化磷酸化产生93个ATP,而15个$FADH_2$产生30个ATP,减去脂酰CoA形成时消耗的2个ATP(节19-2A),一个棕榈酸分子氧化净生成129个ATP。

D. 不饱和脂肪酸的氧化



油酸(9-顺-十八碳烯酸)

亚油酸(9,12-顺-十八碳二烯酸)

几乎所有生物体的不饱和脂肪酸都只含顺式双键,大部分位于C9和C10之间(标记为Δ^9或9-双键,表9-1)。如果有额外的双键,则相隔3个碳原子,因此不能形成共轭,如油酸和亚油酸。值得注意的是亚油酸中一个双键是在奇数碳原子上,另一个是在偶数碳原子上,脂肪酸(如亚油酸)中的双键给β氧化途径带来两个问题,它们是通过另外3个酶的作用解决的(图19-12)。

问题1:β,γ双键

574

第一个酶解反应的困难发生于第3轮β氧化之后:生成的含顺-β,γ双键的烯脂酰CoA不是烯脂酰CoA水化酶的底物。**烯脂酰CoA异构酶**将顺-Δ^3双键转化为反-Δ^2形式,而反-Δ^2化合物是烯脂酰CoA水化酶的正常底物,β氧化可以继续进行。

问题2:Δ^4双键抑制烯脂酰CoA水化酶

下一个困难发生在第5轮β氧化:偶数碳原子的双键导致形成2,4-双烯脂酰CoA,它不是烯脂酰CoA水化酶的底物。而NADPH依赖性的**2,4-双烯脂酰CoA还原酶**将Δ^4双键还原。*E.coli*还原酶生成反式-2-烯脂酰CoA,它是β氧化的正常底物。哺乳动物还原酶则生成反式-3-烯脂酰CoA,它必须先由**3,2-烯脂酰CoA异构酶**异构化为反式-2-烯脂酰CoA后才能继续β氧化途径。

575

E. 奇数碳原子脂肪酸的氧化

大多数脂肪酸,由于节19-4所解释的原因,都含有偶数碳原子而被完全转变为乙酰CoA。然而一些植物和海洋生物却能合成奇数碳原子脂肪酸,这些脂肪酸的最后一轮β氧化生成丙酰CoA,它转化为琥珀酰CoA进入柠檬酸循环。异亮氨酸,缬氨酸和甲硫氨酸的氧化也会产生丙酸和丙酰CoA(节20-4D)。

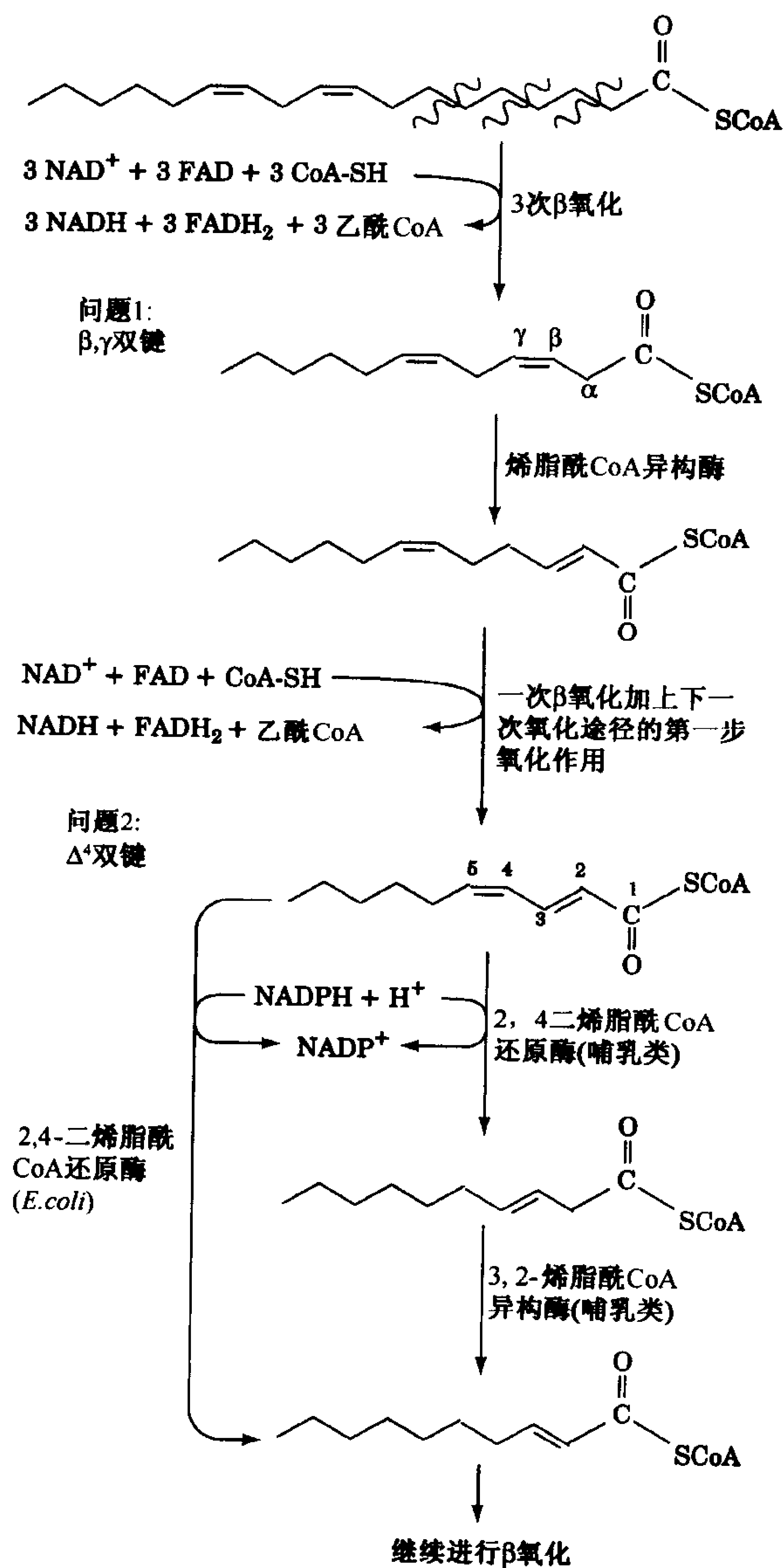


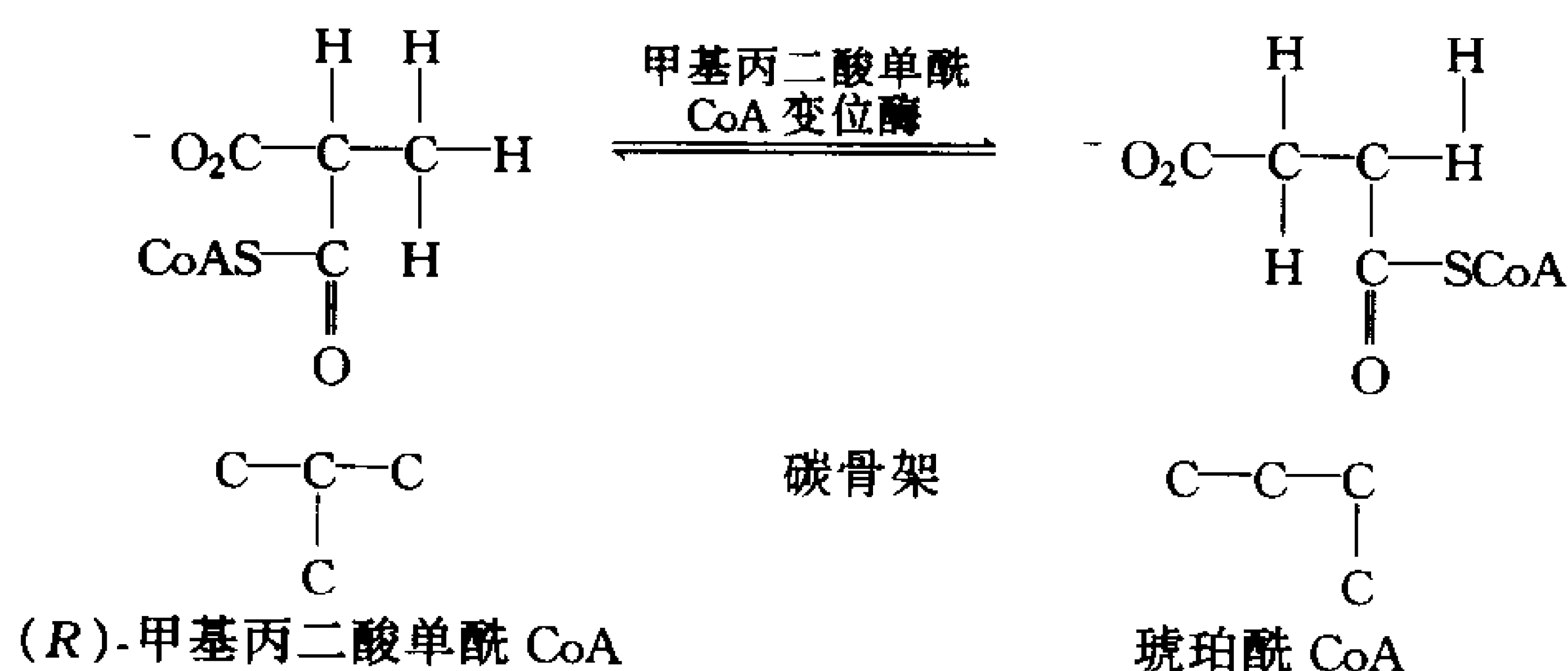
图 19-12 不饱和脂肪酸的氧化

类似于亚麻酸这样的脂肪酸的氧化存在两个问题。第一个问题是β,γ间的双键不能继续β氧化,解决的办法是将其转变为反式α,β双键。第二个问题是2,4-双烯脂酰CoA不易被脂酰水解酶水解,它需要将Δ^4双键还原成为能够进行β氧化的反式-2-脂酰CoA,这是一个依赖NADPH的还原过程。这一反应步骤如发生在*E. coli*内需要一种酶作用,如在哺乳动物体中则需要两种酶的作用。

从丙酰 CoA 转变为琥珀酰 CoA 的过程包括 3 个酶促反应(图 19-13)，第一步反应由**丙酰 CoA 羧化酶**催化，需要生物素辅基，并由 ATP 水解为 ADP 和 P_i 的反应驱动。这个反应与丙酮酸羧化酶的反应相似(图 15-25)。

羧化反应的产物(*S*)-甲基丙二酸单酰 CoA 经**甲基丙二酸单酰 CoA 消旋酶**催化转变为 *R* 形式。(*R*)甲基丙二酸单酰 CoA 是**甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶**的底物，这个酶催化图 19-13 中的第三步反应。

甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶催化一个特殊的碳骨架重排反应，这个酶以 **5′-腺苷钴胺素(辅酶 B_{12}，维生素 B_{12} 或钴胺素**的衍生物，见框 19-1)作辅基。1956 年 Dorothy Hodgkin 通过 X 衍射晶体图谱分析，并结合化学降解研究确定了这个复合物分子的结构(图 19-14)，这是一个具有里程碑意义的成就。



576

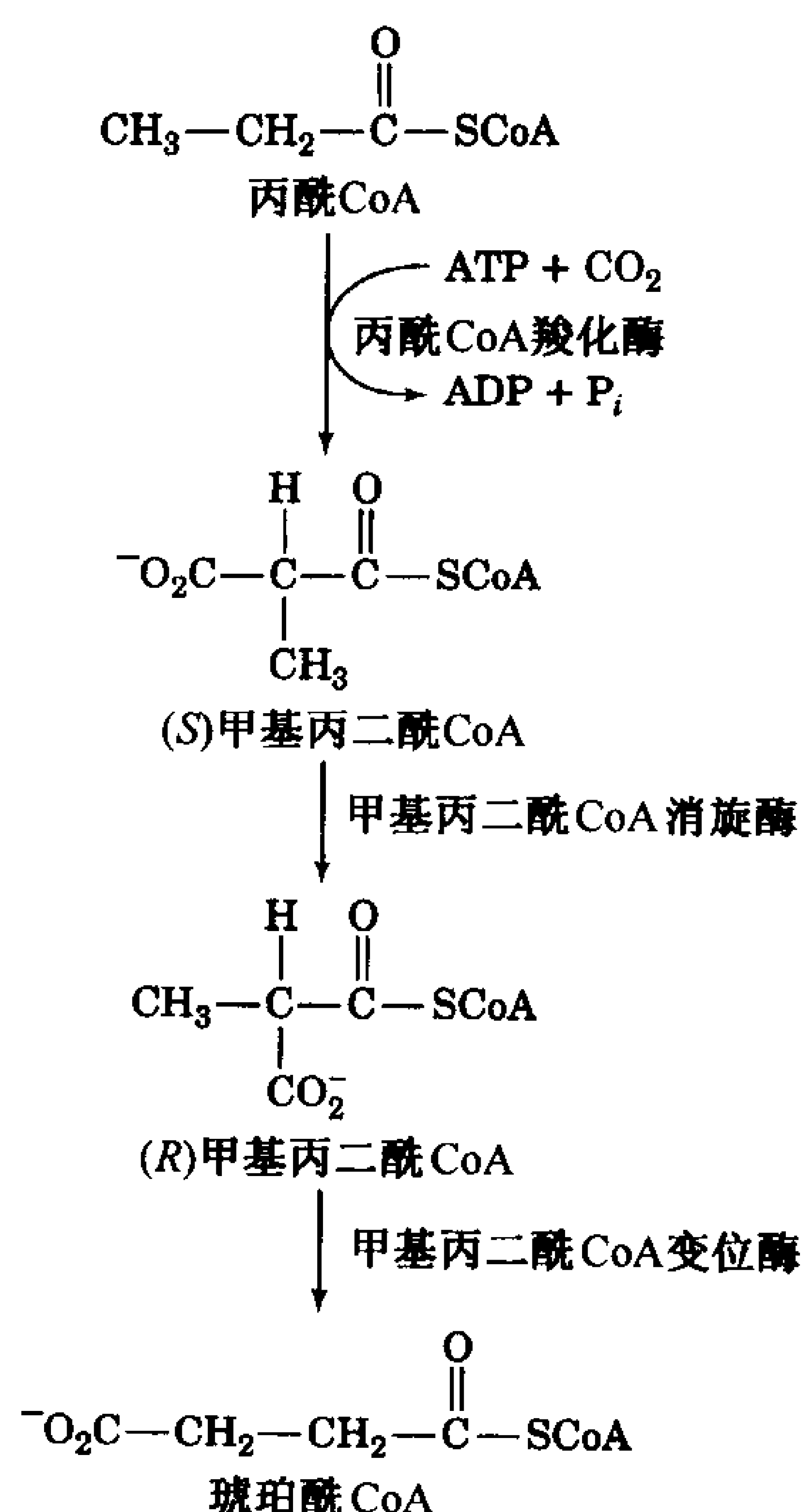


图 19-13　丙酰 CoA 到琥珀酰 CoA 的转化

框 19-1　健康和疾病中的生物化学

维生素 B_{12} 缺乏症

恶性贫血是一种常见的胎儿疾病，其主要的早期病症为红细胞数减少，低水平的血红蛋白和进展性神经退变。1926 年 George Minot 和 William Murphy 发现每日食用大量生肝可以治疗恶性贫血，由此维生素 B_{12} 的存在被认识。但是直到 1948 年才分离得到抗恶性贫血因子——维生素 B_{12}。植物和动物都不能合成维生素 B_{12}，只有少数几种细菌能合成维生素 B_{12}。食草动物从寄生于它们肠道的细菌获得它们所需的维生素 B_{12}(事实上，有些动物如兔子必须定期吃一些它们自己的粪便以获得足够量的这种必需物质)。然而，人类从食物特别是肉食中直接获得几乎全部所需的维生素 B_{12}。而小肠中，一种由胃分泌的糖蛋白固有因子特异结合维生素 B_{12}，形成的蛋白-维生素复合物经由小肠黏膜上的受体而被吸收。然后该复合物被解离，释放出的维生素 B_{12} 被输运到血液中。至少有 3 种不同的血浆蛋白，称之为转钴胺素，结合维生素 B_{12} 并促进其为组织所摄取。

恶性贫血不是通常的饮食缺乏疾病，而是固有因子分泌不足而引起的。正常人需要的钴胺素是很少的，每天 3μg，并且肝脏储存有可供 3～5 年利用的维生素 B_{12}，这样就解释了恶性贫血为什么会不知不觉的突然发病。事实上真正饮食性维生素 B_{12} 缺乏症是极为罕见的，即使在严格素食者中也是如此。

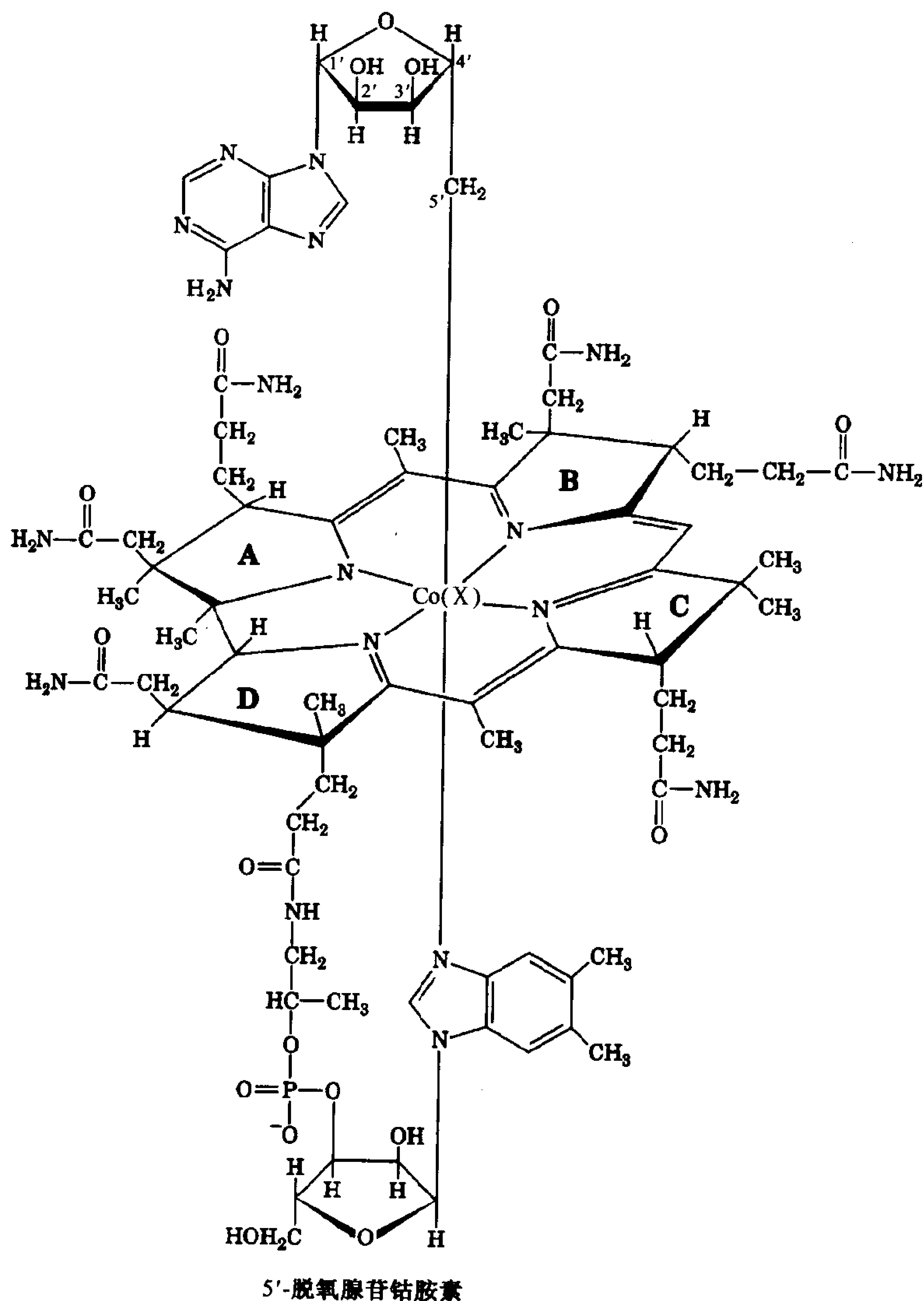


图 19-14 5′-脱氧腺苷钴胺素的结构

5′-腺苷钴胺素含有一个类似血红素的**咕啉**(corrin)环;这个环的 4 个吡咯 N 原子都与六价 Co 离子相连,第五个 Co 配体是 **5,6-二甲基苯并咪唑(DMB)**核苷酸的氮原子,它与咕啉 D 环共价结合,第六个配体是 5′-脱氧腺苷基团,与脱氧核糖的 C5′原子形成一共价 C—Co 键,*这是生物体内已知的两个碳-金属键之一*(另一个是 C—Ni 键,在细菌**碳单氧脱氢酶**中存在),在一些钴依赖性的酶内。第六个配体是一个 CH_3 基团,同样形成 C—Co 键。大约只知道十几种钴依赖性酶,它们催化分子重排或甲基转移反应。

577

甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶稳定和保护自由基中间体

推测甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶的反应机制(图 19-15)是从钴胺素的 C—Co 键的**均裂切割**(homolytic cleavage)开始的(C 和 Co 原子分别得到电子对的一个电子)。Co 离子在 Co(III)和

Co(II)氧化态之间变化，作为一个可逆的自由基发生器。C—Co(III)键更适合于这个功能，因为它的内能很弱（裂解能为 $109kJ \cdot mol^{-1}$），并且通过与酶的空间相互作用进一步减弱（见下面）。值得注意的是均裂切割反应在生物体内是不常见的；大多数其他生物的键剪切反应是经过**异裂切割**（heterolytic cleavage）剪切进行的（即形成切割键的电子对全部为其中一个分离的原子所获得）。生成的 5′-脱氧腺苷自由基从甲基丙二酸单酰 CoA 底物中获得一个氢原子，随之重排，生成琥珀酰 CoA。

578

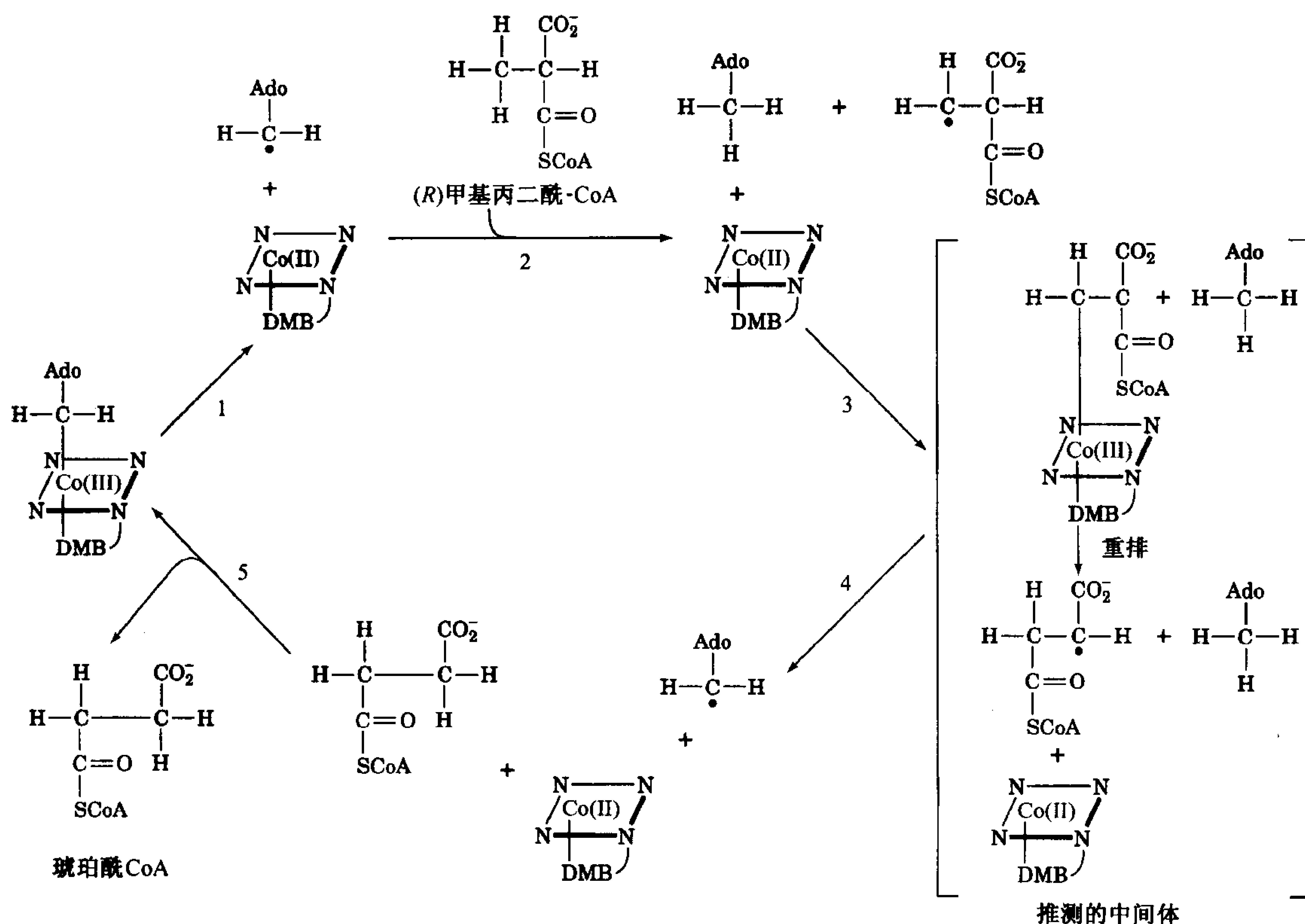


图 19-15 甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶的可能机制

(1)C—Co(III)键均裂生成 5′-脱氧腺苷(Ado)自由基和以 Co(II)氧化态存在的钴铵素。(2)5′-脱氧腺苷自由基从甲基丙二酸单酰-CoA 处获取一个氢原子，同时甲基丙二酸单酰 CoA 变为甲基丙二酸单酰 CoA 自由基。(3)甲基丙二酸单酰 CoA 自由基与辅酶间形成 C—Co 键，随后，碳骨架重排形成琥珀酰 CoA 自由基。(4)琥珀酰 CoA 自由基从 5′-脱氧腺苷酸处获取一个氢原子，重新生成了 5′-脱氧腺苷自由基。(5)琥珀酰 CoA 被释放，辅酶重新生成。

来源于 *Propionibacterium shermanii* 的甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶与其偏好的底物**脱硫 CoA**（desulfo-CoA，底物缺少 S 原子和甲基丙二酸单酰基）形成的复合物的 X 射线结构已由 Philip Evans 确定。辅酶 B_{12}包裹在 α/β 桶的底部，在游离辅酶 B_{12}中，Co 原子垂向与腺苷残基的 $5'CH_2$ 基和 DMB 基团的 N 原子相连接（图 19-14）。然而在这个酶里，DMB 基团被一个蛋白质的组氨酸侧链取代，腺苷残基消失（图 19-16）。光谱测定显示在甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶中 Co 原子是处于 Co(II)状态，进而证明它没有第六键（与它在催化循环中的情况相同；图 19-15）。蛋白诱导链使其组氨酸的 N—Co 键很长（2.5 Å，而在其他含 B_{12}的结构物中为 1.9～2.0 Å），使 Co(II)相对 Co(III)更稳定，从而有助于腺苷自由基的形成。

579

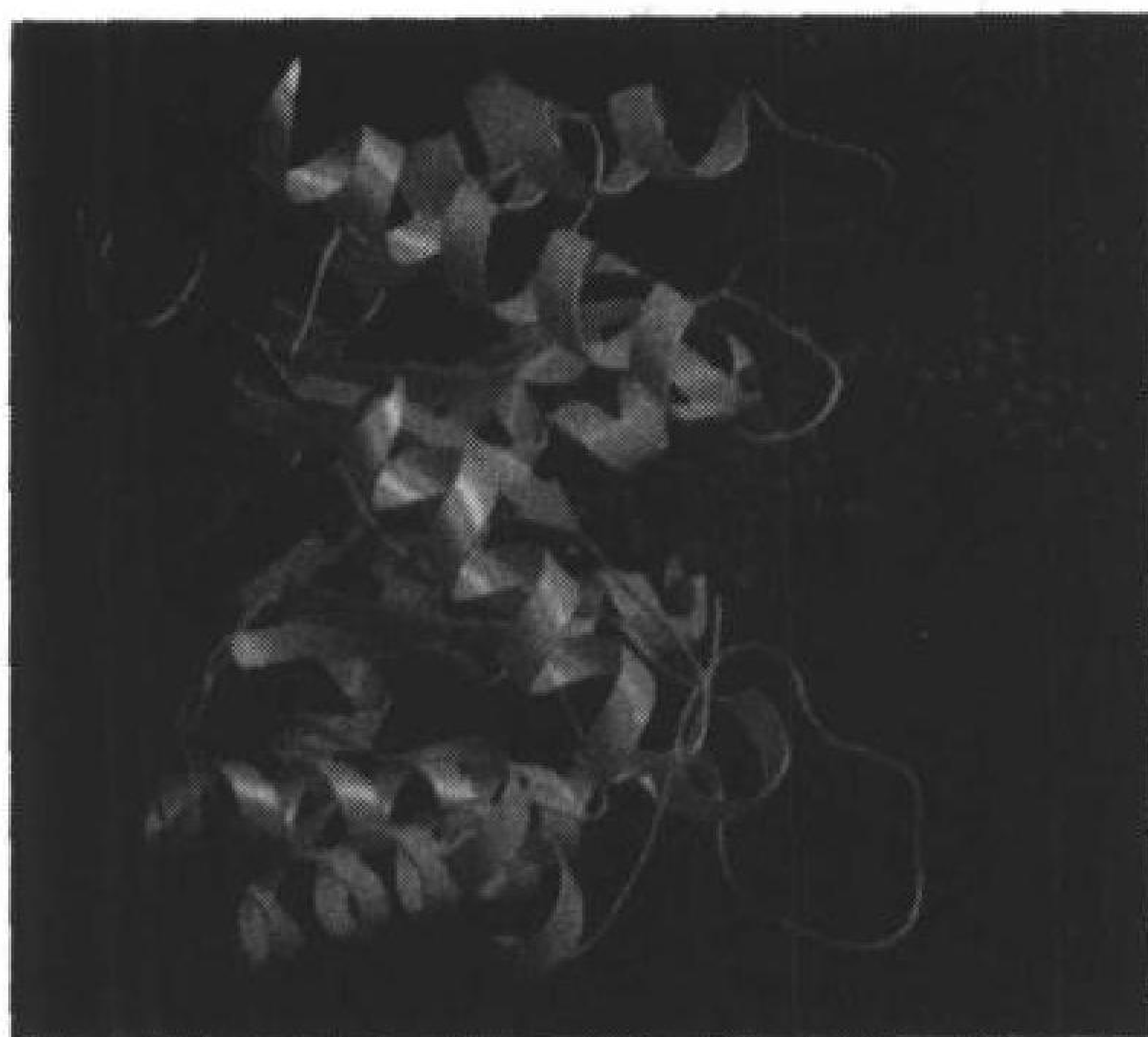
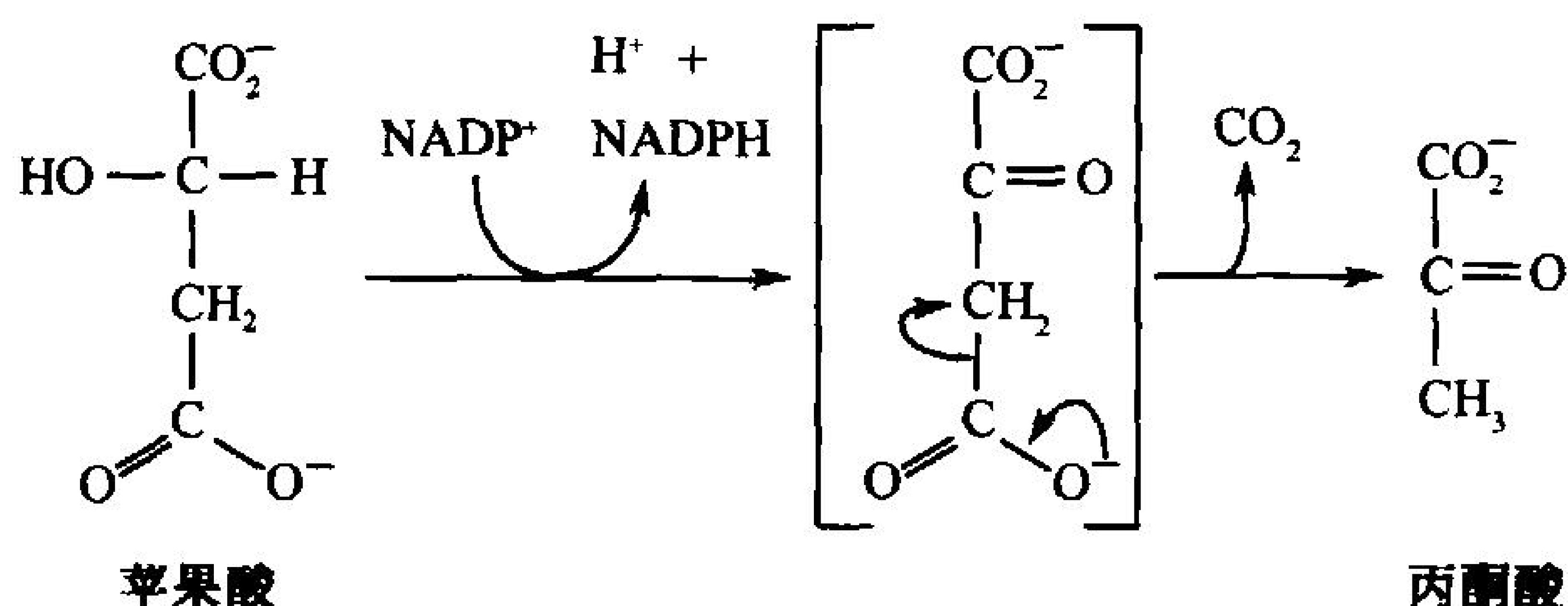


图 19-16 *P. shermanii* 甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶具催化活性的 α 亚基的 N 末端 X 射线结构
此侧视图中，以黄色条带描绘 α/β 桶结构；球-棍模型表示的是它结合的脱硫 CoA(绿)和辅酶 B_{12}(褐)。(引自 Philip Evans, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, U.K.)

借助其沿一狭窄通道延伸直通 α/β 桶中心的泛酰巯基乙胺链，脱硫 CoA 与酶结合，这使得一个完整底物的甲基丙二酸单酰基与 Co 环的顶端(未配位)平面紧密靠近(图 19-16)。这个通道是直通活性中心位点的惟一途径，以避免具有高度反应活性的自由基中间体发生副反应。这个通道依傍着小的亲水残基(Ser 和 Thr)排列，这与已知的约 60 种其他含 α/β 桶的酶不同，这些酶的 α/β 桶的中心被大的、往往带有分支的疏水侧链所阻塞。

琥珀酰 CoA 不直接由柠檬酸循环消耗

甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶催化代谢物转化成柠檬酸循环的中间体而非乙酰 CoA。然而这个 C_4 中间体实际上是柠檬酸循环的催化剂而不是底物。*在琥珀酰 CoA 进入柠檬酸循环彻底氧化前，它必须先转化为丙酮酸再进而转化为乙酰 CoA*。这个过程包括琥珀酰 CoA 转变为苹果酸(柠檬酸循环的 5～7 反应；图 16-2)，苹果酸再由**苹果酸酶**(malic enzyme；这个酶也在光合作用的 C_4 循环中起作用；图 18-26)催化，氧化脱羧生成丙酮酸和 CO_2 几步反应。接着丙酮酸通过丙酮酸脱氢酶和柠檬酸循环彻底氧化。



F. 过氧化物酶体的 β 氧化

脂肪酸的 β 氧化存在于过氧化物酶体及线粒体中。*动物体内过氧化物酶体的 β 氧化将巨长链脂肪酸(>22 碳原子)的烃链缩短，再由线粒体 β 氧化系统进一步降解*。在植物体内，脂肪酸的氧化完全是在过氧化物酶体和乙醛酸循环体(一种特殊的过氧化物酶体)中进行。

巨长链脂肪酸扩散进入过氧化物酶体(不需要肉碱)，被长链脂酰 CoA 合酶活化。脂肪酸在过氧化物酶体的 β 氧化中发生的化学变化与在线粒体中的代谢途径相同，但只需要 3 种酶：

1) 酰基 CoA 氧化酶催化下列反应：



$$\text{脂酰 CoA} + O_2 \longrightarrow \text{反-}\Delta^2\text{-烯脂酰 CoA} + H_2O_2$$

该酶以 FAD 为辅助因子，但是它将接收的电子直接传递给 O_2 而不经过伴随氧化磷酸化作用的电子传递链(图 19-9，5～8 步反应)。因此过氧化物酶体的脂肪酸氧化过程比线粒体的氧化过程每一个 C_2 循环少产生 2 个 ATP。过氧化氢酶催化 H_2O_2 氧化生成 H_2O 和 O_2。

2) 过氧化物酶体的烯脂酰 CoA 水化酶和 3-L-羟脂酰 CoA 脱氢酶活性中心位于一条多肽链

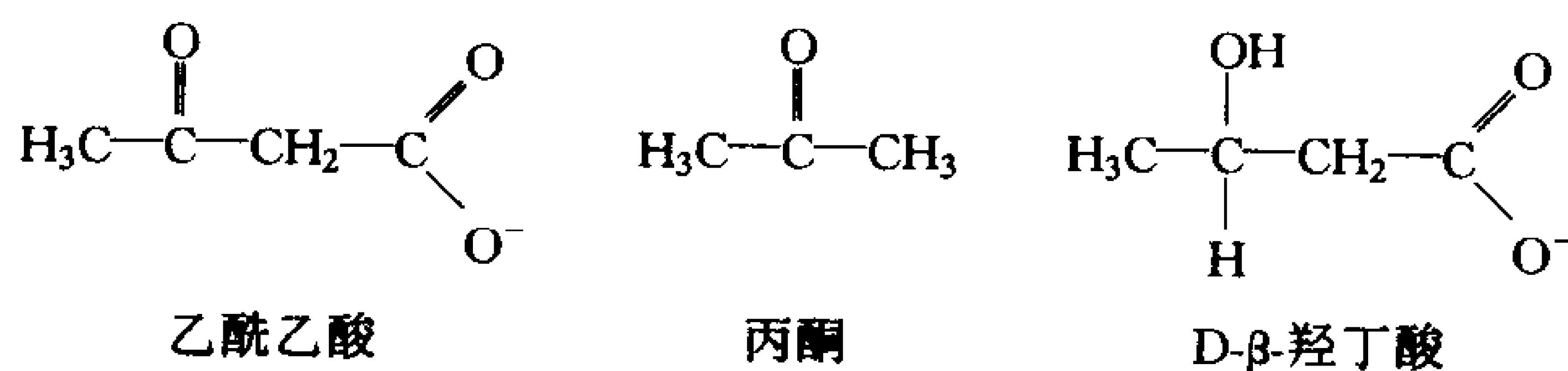
上。催化的反应与线粒体系统中的相同(图 19-9,反应 2 和 3)。

3) 过氧化物酶体的硫激酶催化最后一步氧化反应。这个酶对于链长等于或少于 C_8 的酰基 CoA 几乎没有活性,所以过氧化物酶体中脂肪酸的氧化不完全。

过氧化物酶体含有一个肉碱转乙酰基酶和一个对长链酰基特异的转移酶。被过氧化物酶体 β 氧化缩短了的酰基 CoA 进而转变为肉碱酯。这些物质大部分从过氧化物酶体扩散进入线粒体再进一步氧化。

3. 酮体

由脂肪酸氧化生成的乙酰 CoA 可以通过柠檬酸循环进一步氧化。然而在肝脏线粒体中,相当部分的乙酰 CoA 发生另外的变化。乙酰 CoA 通过**生酮作用**(ketogenesis)转化为**乙酰乙酸**(acetoacetate)或 **D-β-羟丁酸**(D-β-hydroxybutyrate)。这两种化合物与丙酮一起统称为**酮体**(ketone body):



酮体是许多外周组织,特别是心脏和骨骼肌的重要代谢原料。大脑在正常情况下只能以葡萄糖

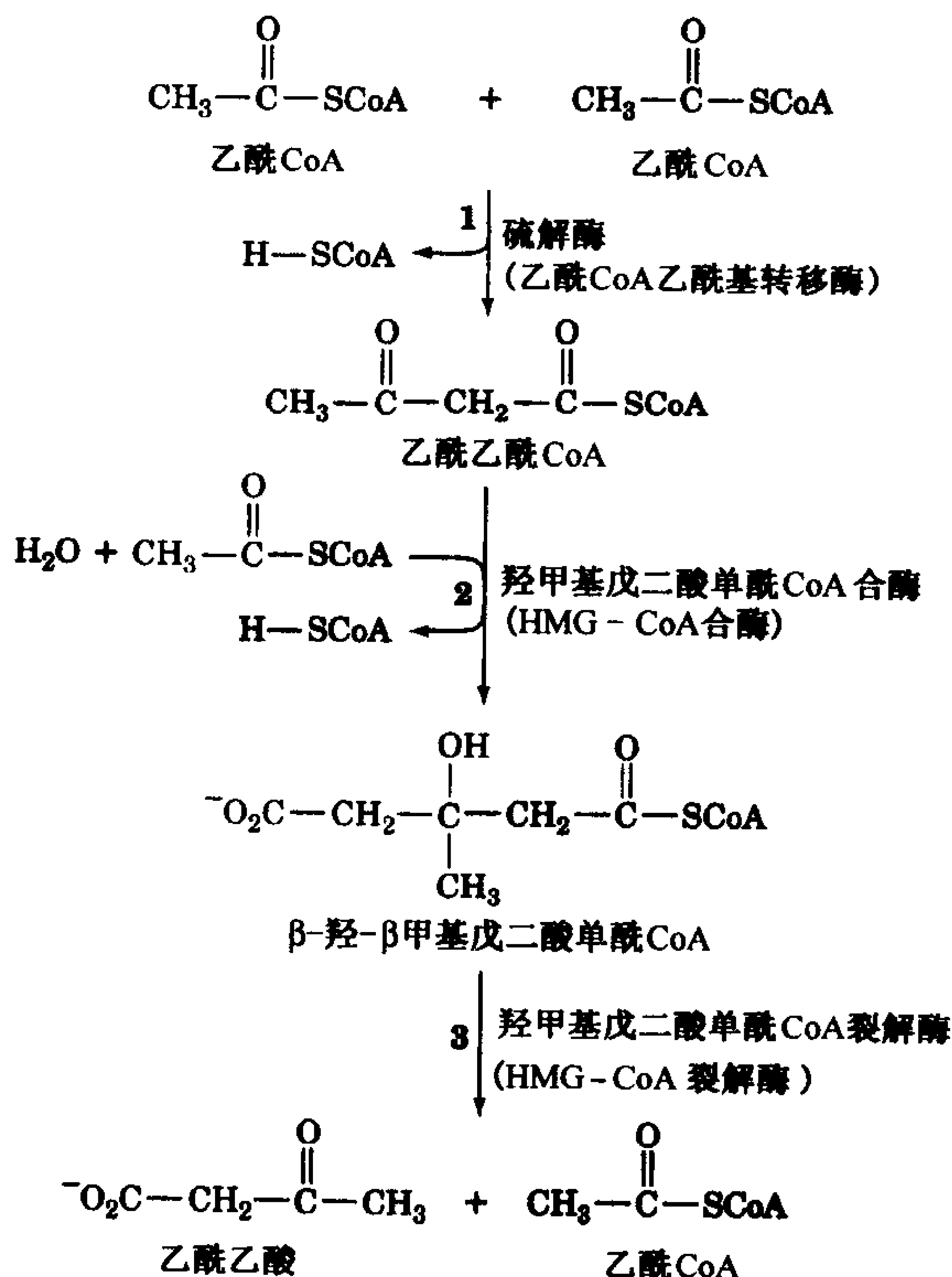


图 19-17 酮体生成作用

乙酰乙酸由乙酰 CoA 开始经过三步生成。(1)两个分子的乙酰 CoA 缩合为乙酰乙酰 CoA。(2)乙酰乙酰 CoA 与第三个乙酰CoA经克莱森酯缩作用生成β-羟-β-甲基戊二酰CoA(HMG-CoA)。(3)经混合的醛醇-克莱森酯裂解作用,HMG-CoA 降解生成乙酰乙酸和乙酰 CoA。

作为能源(脂肪酸不能透过血脑屏障),但在饥饿时这些小分子的水溶性酮体成为脑的主要能源(节 21-4A)。

乙酰乙酸由三步反应形成 (图 19-17):

1) 2 分子的乙酰 CoA 缩合成**乙酰乙酰 CoA**,该反应由硫激酶催化(也称为**乙酰 CoA 酰基转移酶**),该反应是 β 氧化最后一步反应的逆反应(图 19-9,反应 4)。

2) 乙酰乙酰 CoA 与第 3 分子乙酰 CoA 缩合生成 **β-羟-β-甲戊二酰 CoA**(HMG-CoA),反应由 **HMG-CoA 合酶**催化。该反应的机制与硫激酶催化反应的逆反应类似(图 19-11),反应中活性中心的巯基形成酰基巯酯中间体。

3) HMG-CoA 由 **HMG-CoA 裂解酶**催化发生混合型的醛醇-Claisen 酯解反应而降解为乙酰乙酸和乙酰 CoA,反应机制与柠檬酸合酶催化反应的逆反应类似(图 16-9)。HMG-CoA 也是胆固醇生物合成的前体(节 19-7A)。

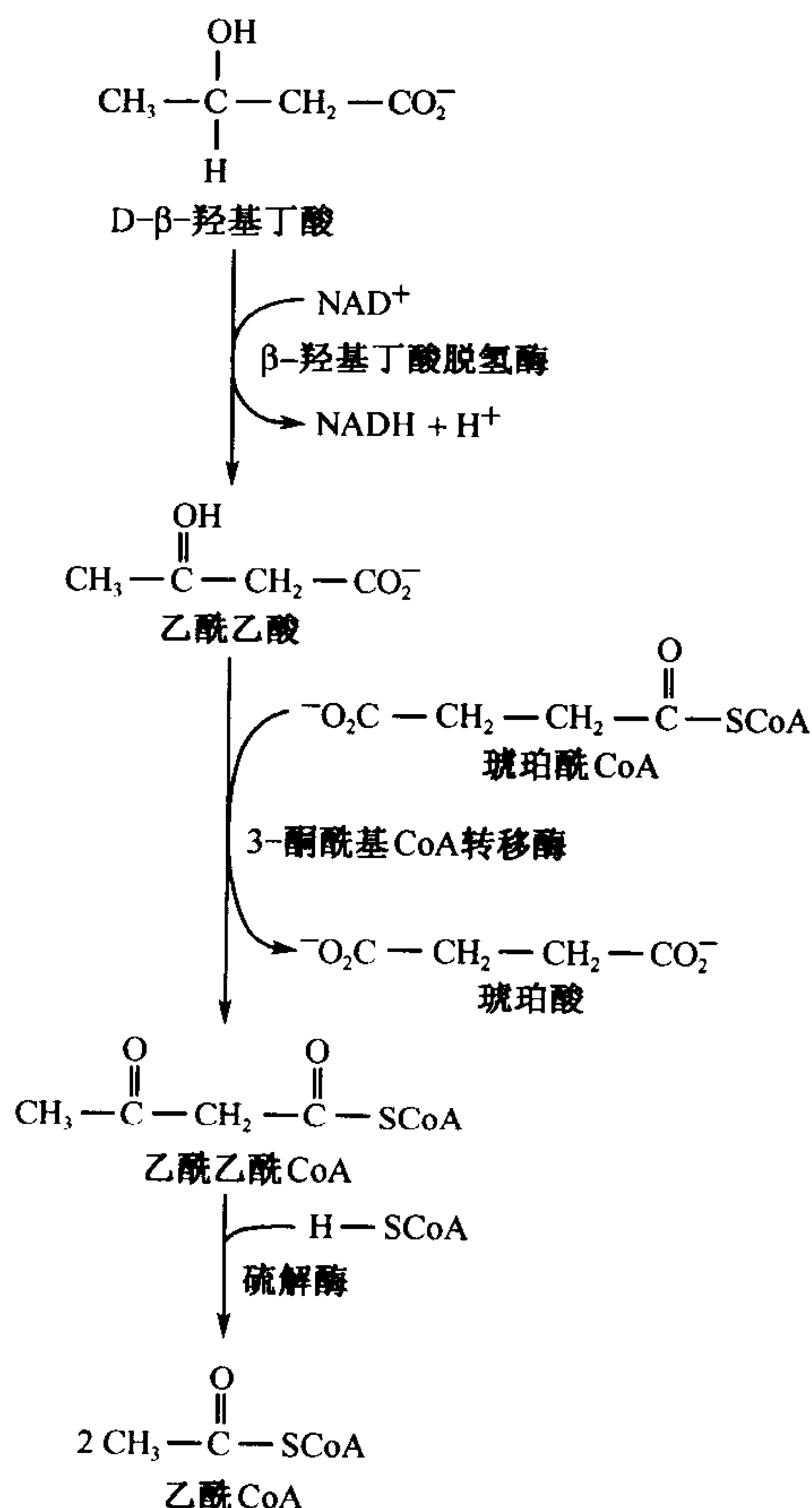
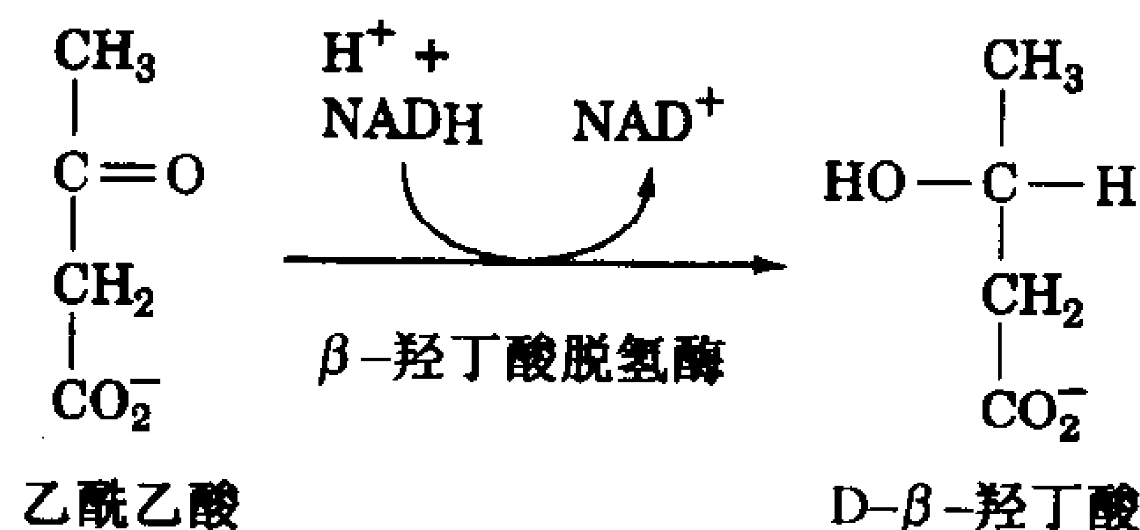


图 19-18 酮体转化为乙酰 CoA 的代谢过程

乙酰乙酸(一种 β-酮酸)可以被 **β-羟丁酸脱氢酶**还原成 D-β-羟丁酸:



也可经相对简单的非酶促脱羧反应生成丙酮和 CO_2。事实上,患有**酮症**(ketosis)的病人,由于乙酰乙酸生成速度大于分解代谢速度(糖尿病人的一种症状;节 21-4B),其呼吸出的气体中带有丙酮的特殊甜味。

肝脏释放的乙酰乙酸和 β-羟丁酸,由血液送至外周组织,作为替代能源被利用。在组织中,这些产物转化为 2 分子乙酰 CoA,如图 19-18 所示。琥珀酰 CoA,在该过程中作为 CoA 供体,也可以转化为琥珀酸,同时生成 GTP,这个反应与柠檬酸循环中琥珀酰 CoA 合成酶催化的反应相同(节 16-3E)。乙酰乙酸的"活化"则越过这步反应,并因此"消耗"GTP 水解的自由能。

4. 脂肪酸的生物合成

脂肪酸的生物合成是 C_2 单位的缩合作用,为 β 氧化的逆过程。通过同位素标记技术,David Rittenberg 和 Konrad Bloch 于 1945 年证明这些缩合单位是乙酸的衍生物。随后的研究表明合成需要乙酰-CoA 和碳酸氢盐,一个 C_3 单位——**丙二酸单酰 CoA** 则是脂肪酸生物合成的中间

体。

脂肪酸合成途径不同于脂肪酸氧化途径，如节 15-3 所示，这是一个生物合成与降解途径相对独立进行的典型例子，因为它允许这两个过程在热力学上都可进行，并且在相似的生理条件下受独立的机制调控，图 19-19 概括了脂肪酸氧化和合成途径之间的主要差别，包括途径的细胞定位、氧化还原辅酶、及 C_2 单位从脂酰链上减去和加上方式的差异。

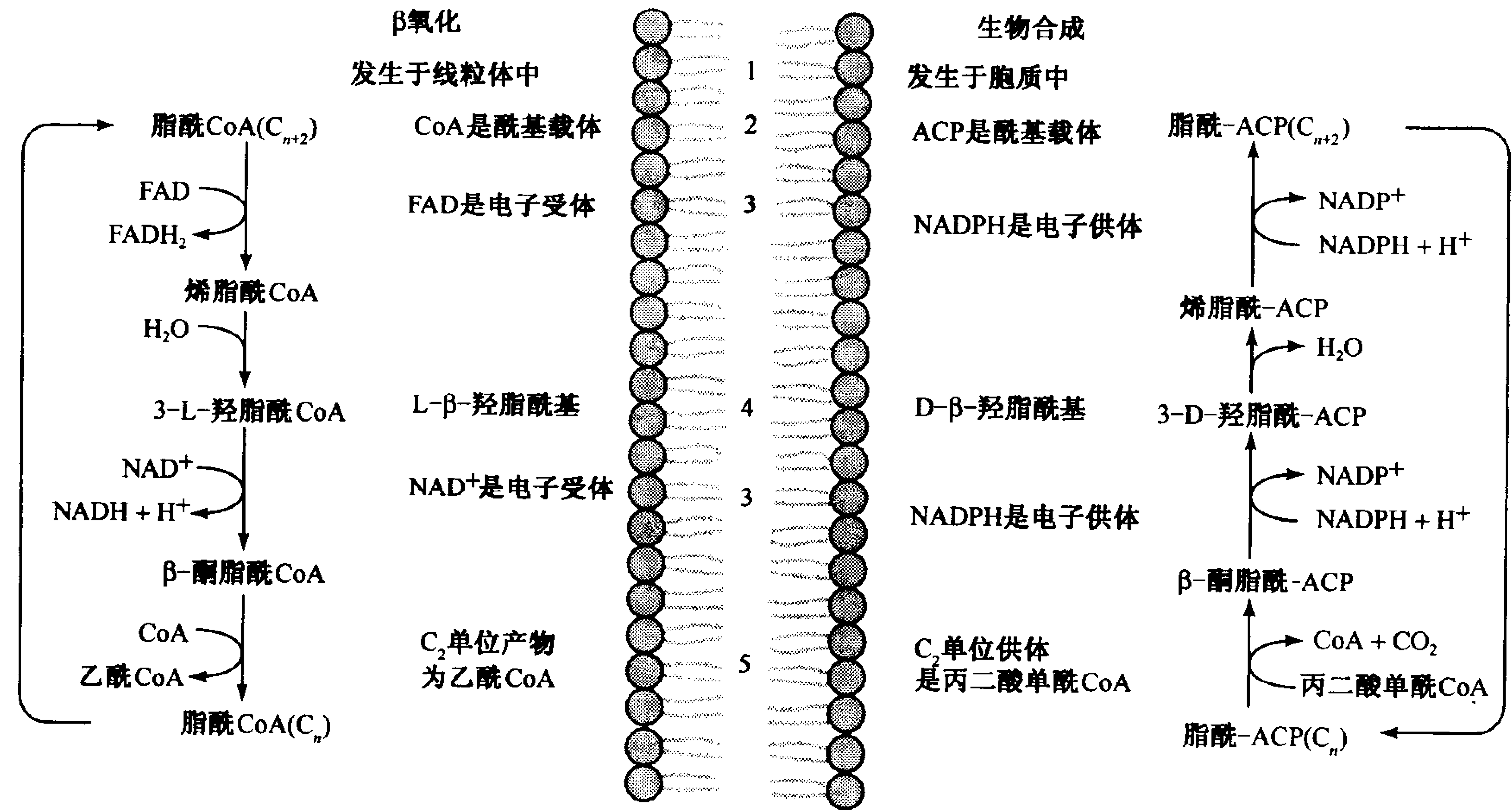


图 19-19　脂肪酸 β 氧化与脂肪酸合成途径的比较

它们在以下几方面不同：(1)细胞内定位。(2)脂酰基载体。(3)电子受体/供体。(4)水合与脱水反应的立体化学。(5)生成和提供 C_2 单位的形式。

A. 线粒体乙酰 CoA 转运到细胞质

乙酰 CoA 作为脂肪酸合成的初始原料，是在线粒体中由丙酮酸脱氢酶催化丙酮酸氧化脱羧(节 16-2B)或由脂肪酸氧化生成。当 ATP 的需求降低时，乙酰 CoA 沿柠檬酸循环的氧化及氧化磷酸化作用的强度都减弱，线粒体乙酰 CoA 就贮存起来以备将来合成脂肪。脂肪酸生物合成是在胞质中进行，但是乙酰 CoA 却不能透过线粒体膜。*乙酰 CoA 是通过*三羧酸转运系统(cricarboxylate transport system)*以柠檬酸的形式进入胞质*(图 19-20)。**ATP-柠檬酸裂解酶**(ATP-citrate lyase)催化下列反应：

583



柠檬酸 + CoA + ATP ⟶ 乙酰 CoA + 草酰乙酸 + ADP + P_i

这个反应与柠檬酸合成反应(图 16-9)的逆反应类似，只是硫酯键的生成需要 ATP 水解反应驱动。草酰乙酸由苹果酸脱氢酶催化还原成苹果酸。苹果酸再由苹果酸酶催化氧化脱羧生成丙酮酸重新进入线粒体。这一反应过程包括苹果酸再氧化成草酰乙酸(一种 β-酮酸)，然后再进行脱羧，此反应与柠檬酸循环中的异柠檬酸脱氢酶催化的反应相同(节 16-3C)，所产生的 NADPH 将用于脂肪酸生物合成的还原反应。

584

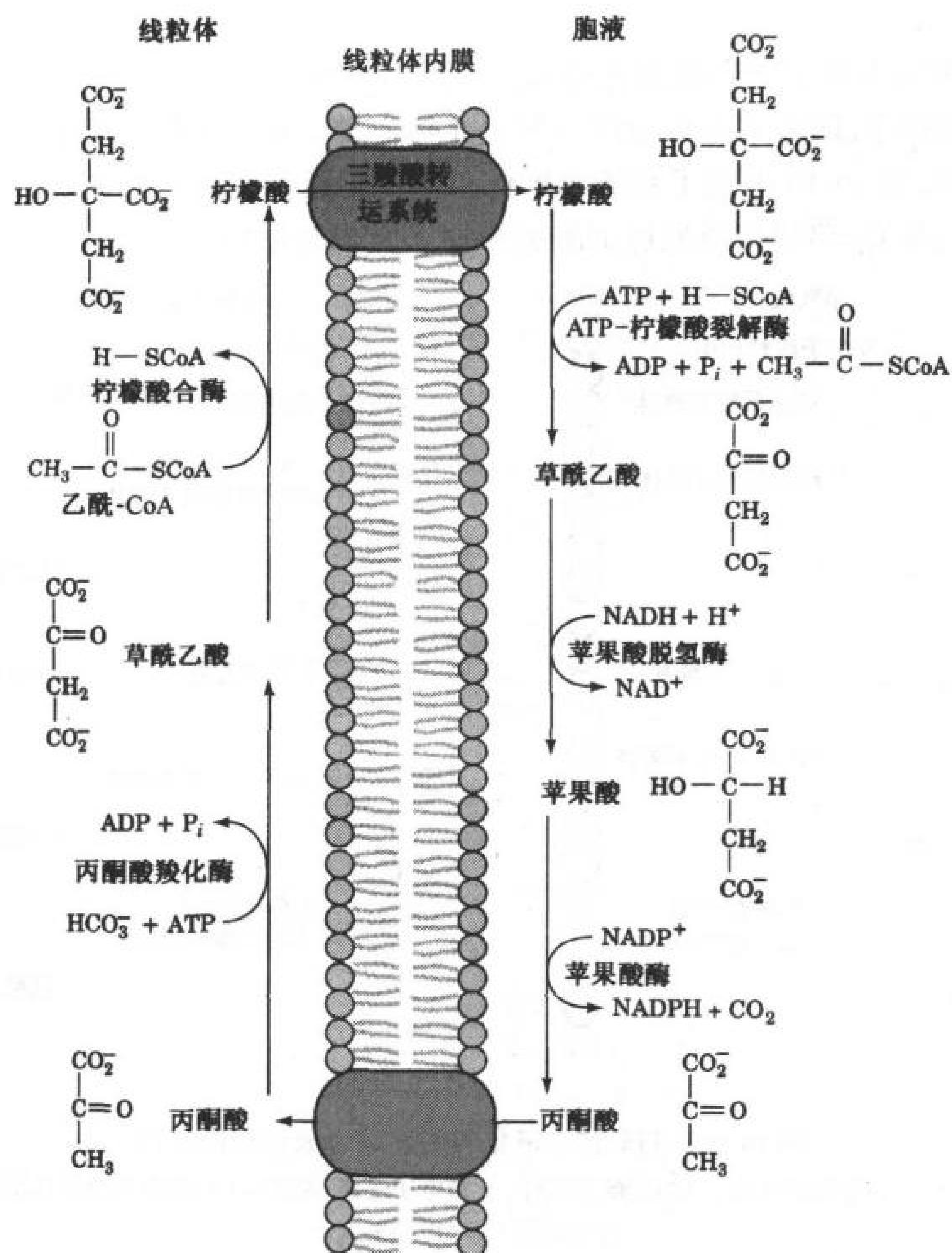
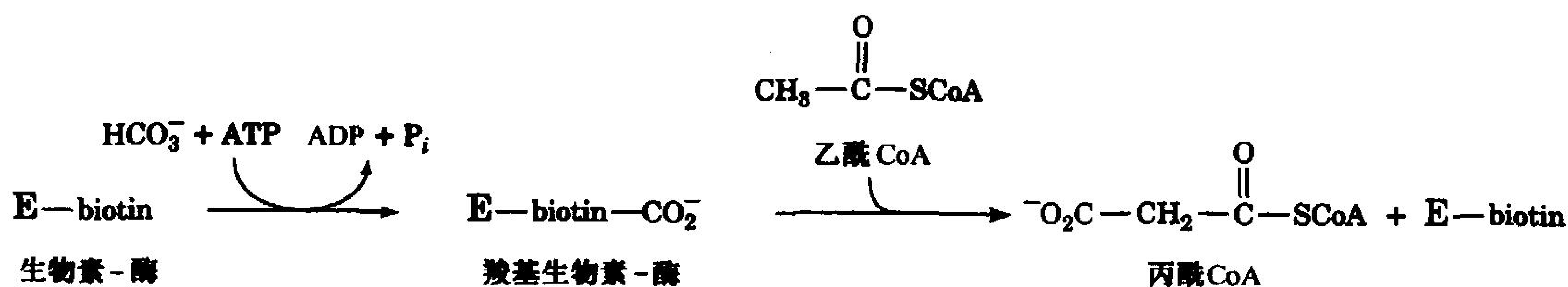


图 19-20 三羧酸转运系统

通过这一连串反应将乙酰 CoA 从线粒体中输运到细胞液中。

B. 乙酰 CoA 羧化酶

乙酰 CoA 羧化酶催化脂肪酸生物合成的第一个调控反应，该反应是限速步骤之一。这个生物素依赖性酶的作用机制与丙酰 CoA 羧化酶(节 19-2E)和丙酮酸羧化酶(图 15-25)相似，反应分为两步，CO_2 的激活和羧化反应。结果是一个 C_3 基团(丙二酰基)与 CoA 相连形成硫酯。



哺乳动物乙酰 CoA 羧化酶是 230kDa 的多肽，受别构调节和激素调节。例如，柠檬酸激活乙酰-CoA 羧化酶，可能是通过重新定位生物素辅基来提高 V_{max}。长链脂酰 CoA 是酶的反馈抑制剂，酶活性的精细调节是通过酶的共价修饰完成的。乙酰 CoA 羧化酶是几种激酶的底物，它有 6 个磷酸化位点，但是仅有 1 个位点(Ser 79)的磷酸化与酶的失活密切相关。Ser 79 通过一个不依赖 cAMP 的途径被 **AMP-依赖性蛋白激酶**磷酸化。然而，胰高血糖素和肾上腺素通过 cAMP-依赖性蛋白激酶(cAPK；节 15-3C)促使 Ser 79 磷酸化的作用，可能是抑制它的去磷酸化(在糖原代谢中 cAPK 介导的磷酸化作用，当磷蛋白磷酸酶抑制剂-1 抑制去磷酸化时，也发生这种情况)。另一方面胰岛素激发乙酰 CoA 羧化酶去磷酸化而激活这个酶。

大肠杆菌乙酰 CoA 羧化酶是一个多亚基蛋白，受鸟苷酸调节，以便协调脂肪酸合成与细胞生长。在原核生物中，脂肪酸主要作为磷脂的前体，因为它们不能合成三酰甘油来贮存能量。　585

C. 脂肪酸合酶

脂肪酸，主要是棕榈酸的合成，是从乙酰 CoA 和丙二酸单酰 CoA 开始，经过 7 步酶促反应完成的。这些反应首先在大肠杆菌的无细胞提取液中进行了研究，它们分别由不同的酶催化。具有这类活性的专一性酶在叶绿体中(植物脂肪酸合成不是在胞质中完成)也存在。酵母的**脂肪酸合酶**(fatty acid synthase)位于胞质中，是 2500kDa 的多功能酶，其组成是 $\alpha_6\beta_6$。而在动物里，该酶是由两条相同多肽链组成的 534kDa 的多功能酶。也许，这些蛋白是由原已独立存在的酶结合而成。

尽管脂肪酸的生物合成始于一个 CoA 酯(丙二酸单酰 CoA)的合成，而伸长中的脂肪酸是锚定在一个**酰基载体蛋白**(ACP；图 19-21)上。ACP 和 CoA 一样，含有一个磷酸泛酰巯基乙胺基团，它可与酰基形成硫酯键。磷酸泛酰巯基乙胺的磷酸基团与 ACP 的 Ser OH 基酯化，而在 CoA 中，它是与 AMP 相连。在大肠杆菌中，ACP 是一条 10kDa 的多肽，而在动物中，它是多功能脂肪酸合酶的一部分。

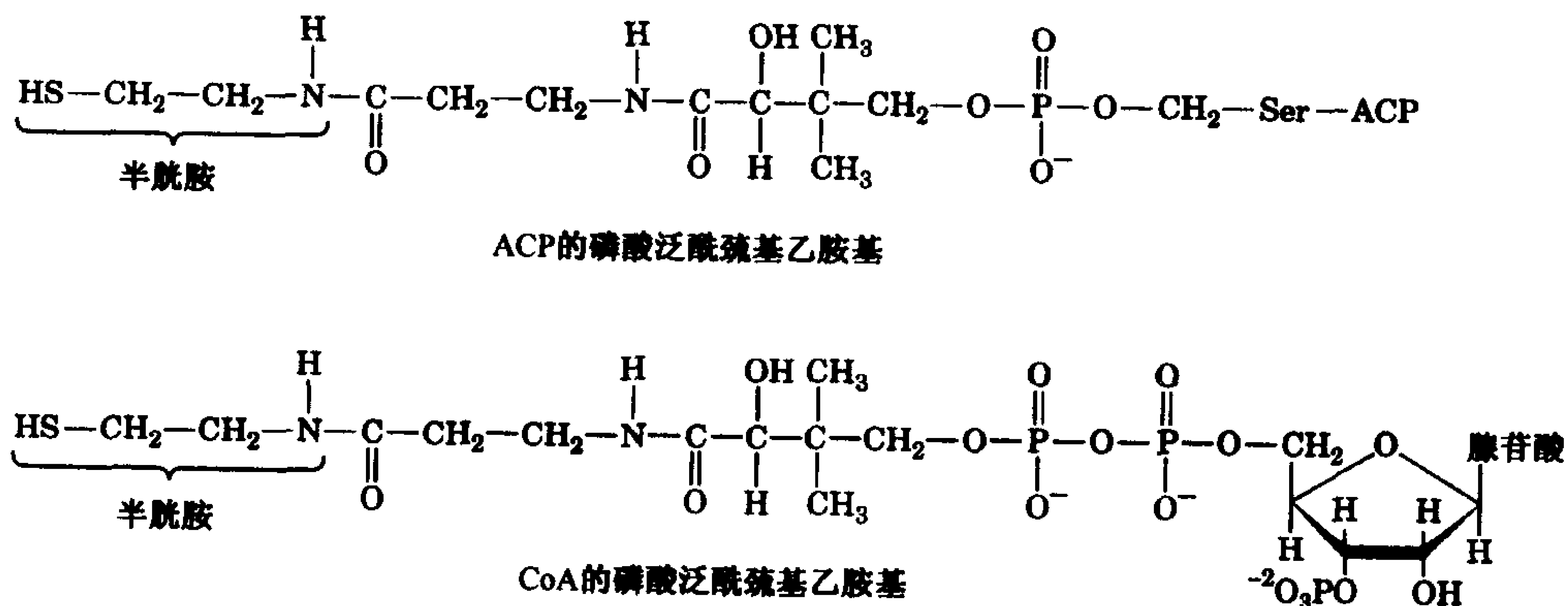


图 19-21　脂酰载体蛋白 ACP 和 CoA 中的磷酸泛酰巯基乙胺基

哺乳动物脂肪酸合酶催化的反应如图 19-22：

1 和 2) 初始反应，合酶与聚合反应的前体“接合”：一个原连接在乙酰 CoA 硫酯中的乙酰基首先转移至 ACP(1)，然后再转移至酶的 Cys 残基(2a)；与此类似，一个丙二酸单酰基也从丙二酸单酰 CoA 转移至丙二酸单酰 ACP(2b)。

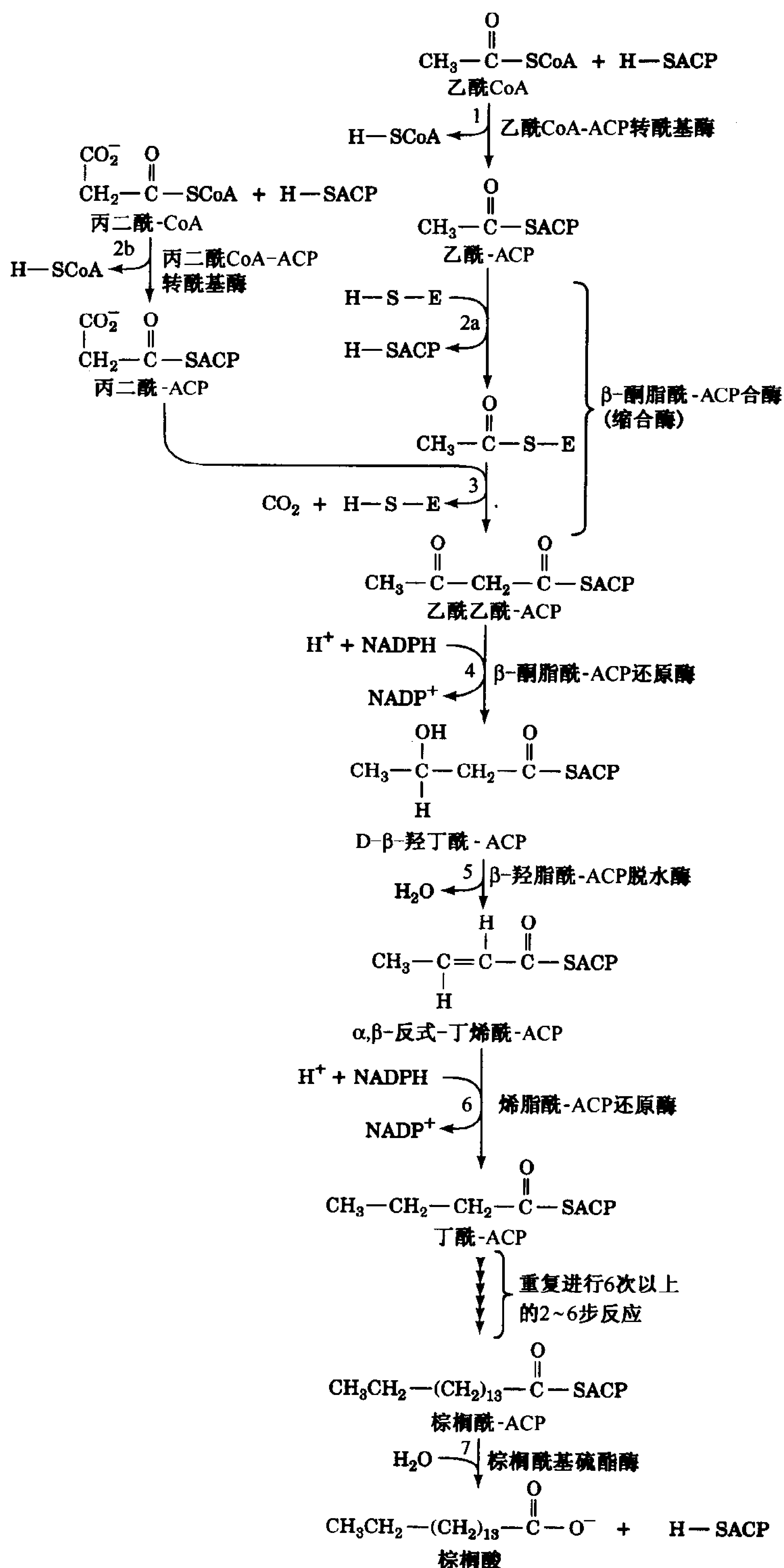


图 19-22 代谢的秘诀:脂肪酸的生物合成途径

在生成棕榈酸的过程中,经过 7 个循环的 C_2 单位延长反应和最后一步水解反应。

3）聚合反应中，丙二酸单酰-ACP 脱羧形成的负碳离子攻击乙酰硫酯形成一个四碳的 β-酮脂酰-ACP，脱羧反应驱动聚合反应。

4～6）两个还原反应和一个脱水反应将 β-酮基转化为烷基，两个还原反应的辅酶都是 NADPH。在 β 氧化中，与反应 4 和 6 相对应的反应分别使用 NAD^+ 和 FAD 作为辅酶（图 19-9，反应 3 和 1）。另外，反应 5 要求一个 D-β-羟脂酰底物，而在 β 氧化的类似反应中则形成相应的 L 异构体。

此时，原来的乙酰基延长了一个 C_2 单位，这个丁酰基再从 ACP 转移到酶的 Cys-SH 上（2a 反应的重复），这样它便随脂肪酸合酶催化的反应系列的不断重复而延伸。需注意的是，由乙酰 CoA 羧化酶催化生成的丙二酸单酰 CoA 在聚合反应中的脱羧。C—C 键的形成是一个需要活化前体的耗能过程。丙二酸单酰 CoA 是一个 β-酮酯，它的放能脱羧可以产生形成 C—C 键所必需的负碳离子。整个反应所需的自由能是由乙酰 CoA 羧化生成丙二酸单酰 CoA 的反应中 ATP 的水解提供。这个羧化-脱羧化过程与丙酮酸活化成草酰乙酸进而转化为磷酸烯醇式丙酮酸的糖原合成过程相似（节 15-4A）。 586

在每次反应循环中，ACP 携带一个丙二酸单酰基，酰基链伸长两个碳原子。合成棕榈酰 ACP 需要进行 7 次这样的循环。然后硫酯键被**棕榈酰基硫酯酶**（palmitoyl thioesterase）水解（图 19-22，反应 7），生成棕榈酸，即脂肪酸合成途径的正常产物，而酶则重新进入新一轮循环。

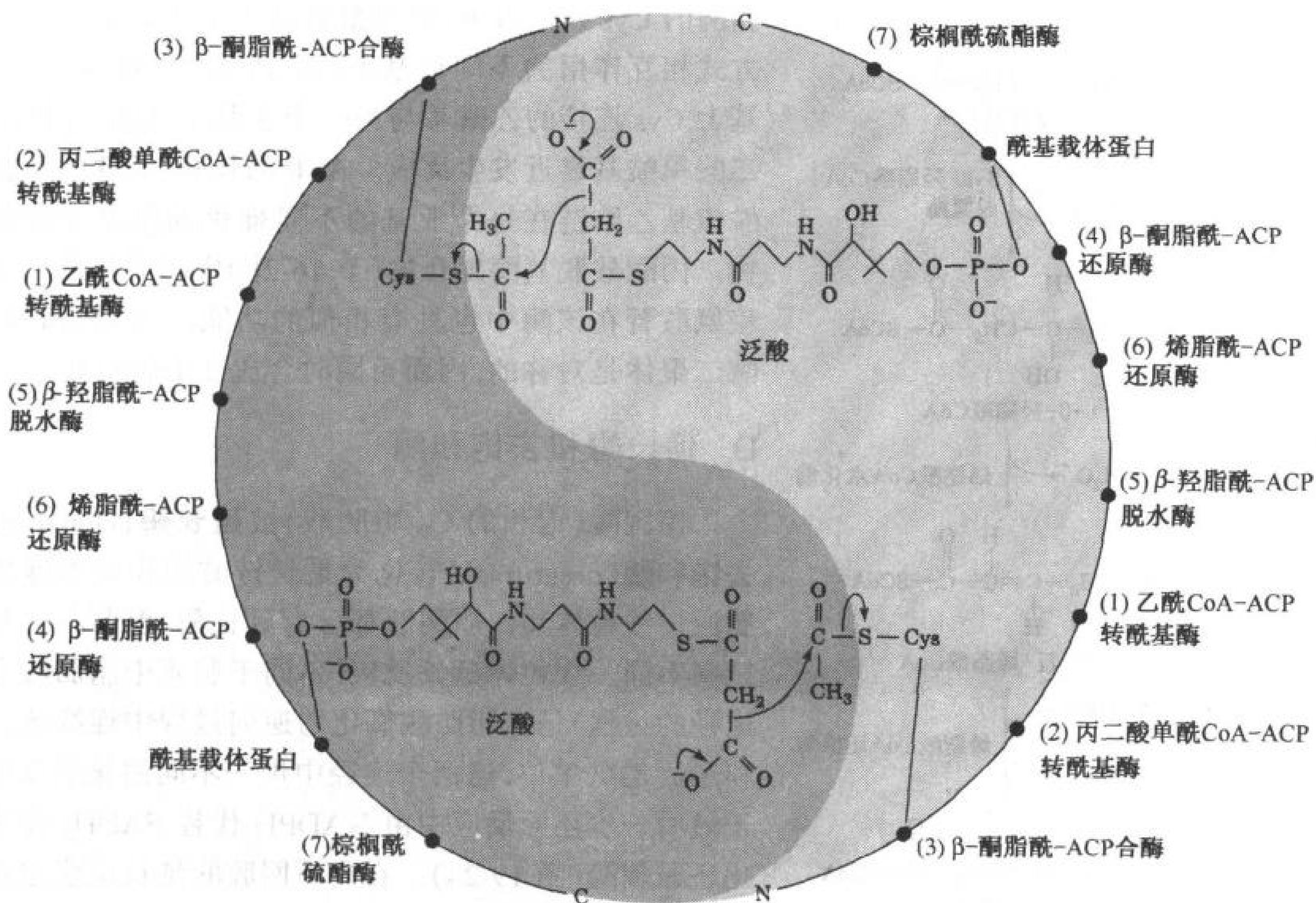


图 19-23　动物脂肪酸合成的图示

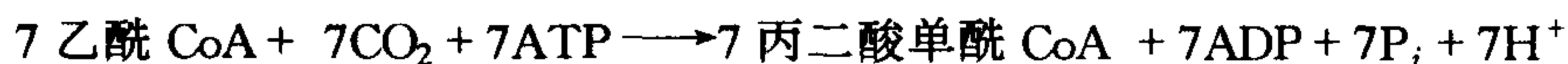
两个多功能亚基以头尾相连的形式形成活性的二聚体。反应序号参见图 19-22。本图中酰基载体蛋白（ACP）和必需的 Cys 以在 β-酮脂酰 ACP 合酶催化下它们的脂酰化形式表示。[引自 Wakil, S.J., Stoops, J.K., and Joshi, V.C., *Annu. Rev. Biochem*. 52, 556(1983)]

棕榈酸合成的化学计量式为：



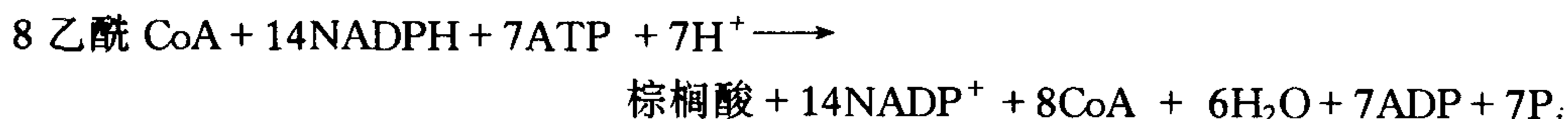
$$乙酰\ CoA + 7\ 丙二酸单酰\ CoA + 14NADPH + 14H^+ \longrightarrow 棕榈酸 + 7CO_2 + 14NADP^+ + 8CoA + 6H_2O$$

因为7个丙二酸单酰 CoA 是来自于乙酰 CoA，其化学反应式为：



$$7\ 乙酰\ CoA + 7CO_2 + 7ATP \longrightarrow 7\ 丙二酸单酰\ CoA + 7ADP + 7P_i + 7H^+$$

棕榈酸生物合成的总反应式为



$$8\ 乙酰\ CoA + 14NADPH + 7ATP + 7H^+ \longrightarrow 棕榈酸 + 14NADP^+ + 8CoA + 6H_2O + 7ADP + 7P_i$$

脂肪酸合酶的两个亚基协调工作

当脂肪酸合酶的天然二聚体解离成单体时，它仍然保留对图 19-22 中的反应 2a 和反应 4 以外的其余反应的催化活性。电镜和脂肪酸合酶的限制性蛋白酶解证明脂肪酸合酶的多肽链折叠成一系列独立的结构域，每个结构域具有不同的催化活性。几种其他的酶也表现出相似的多功能性，但是没有一种酶具有脂肪酸合酶这样广泛的催化活性。

因为聚合反应要求 ACP 磷酸泛酰巯基乙胺的巯基和酶的 Cys 残基并列，所以推测这些基团是位于以头尾方式相互作用的不同亚基上(图 19-23)。这样，一个亚基上 Cys 连接的乙酰基与另一个亚基上 ACP 连接的丙二酸单酰基靠近发生反应。ACP 的长的、柔软的磷酸泛酰巯基乙胺链在每个亚基的不同催化部位之间转运底物。丙酮酸脱氢酶复合物(节 16-2B)中的柔软的硫辛酰赖氨酸臂在该酶中也具有相似的功能。因为脂肪酸合酶二聚体是对称的，因而可同时合成 2 个脂肪酸分子。

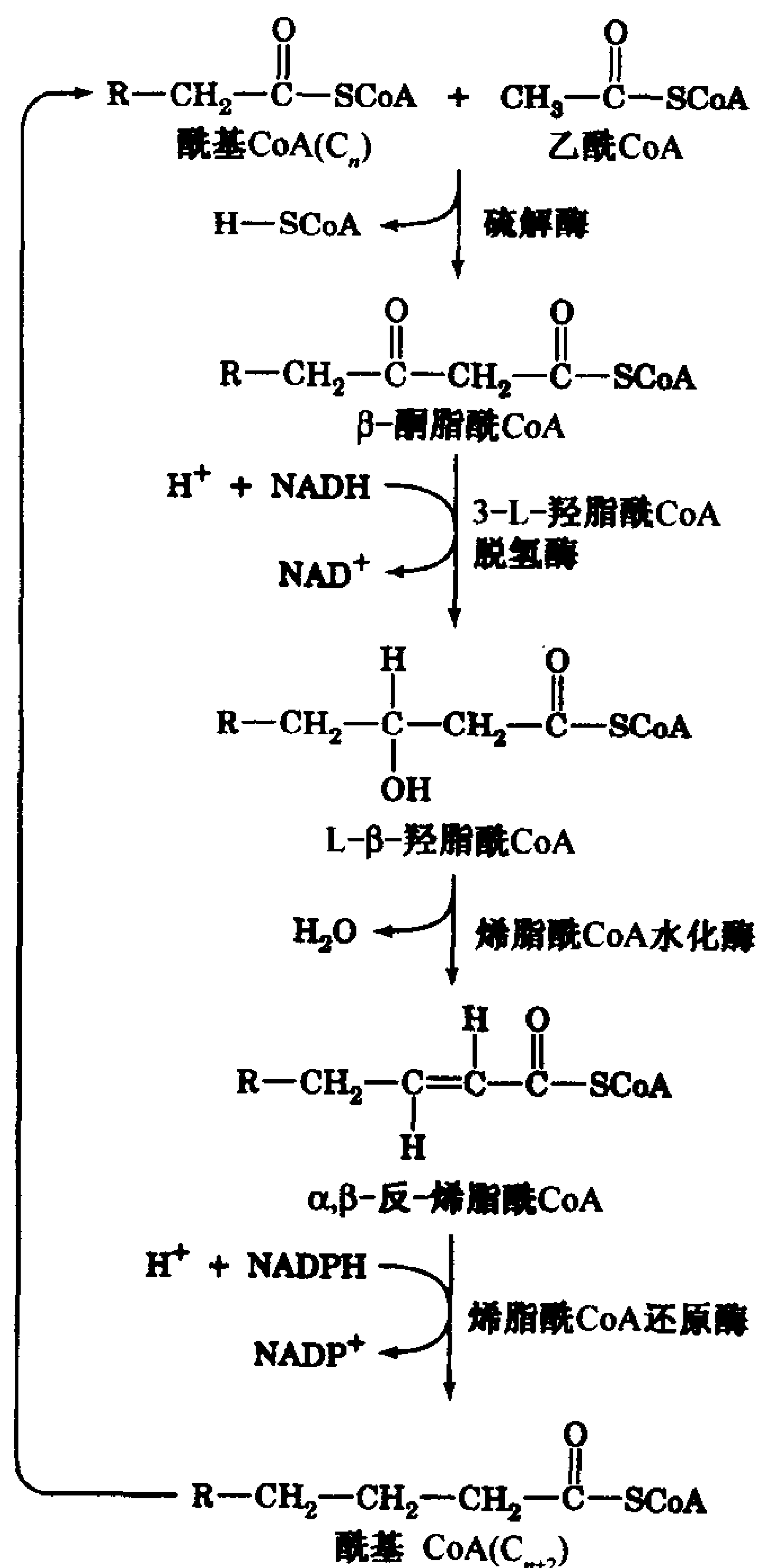


图 19-24 线粒体的脂肪酸延长作用

这个过程是脂肪酸氧化(图 19-9)的逆反应，不同的是最后的反应以 NADPH 而不是 $FADH_2$ 作为其氧化还原辅酶。

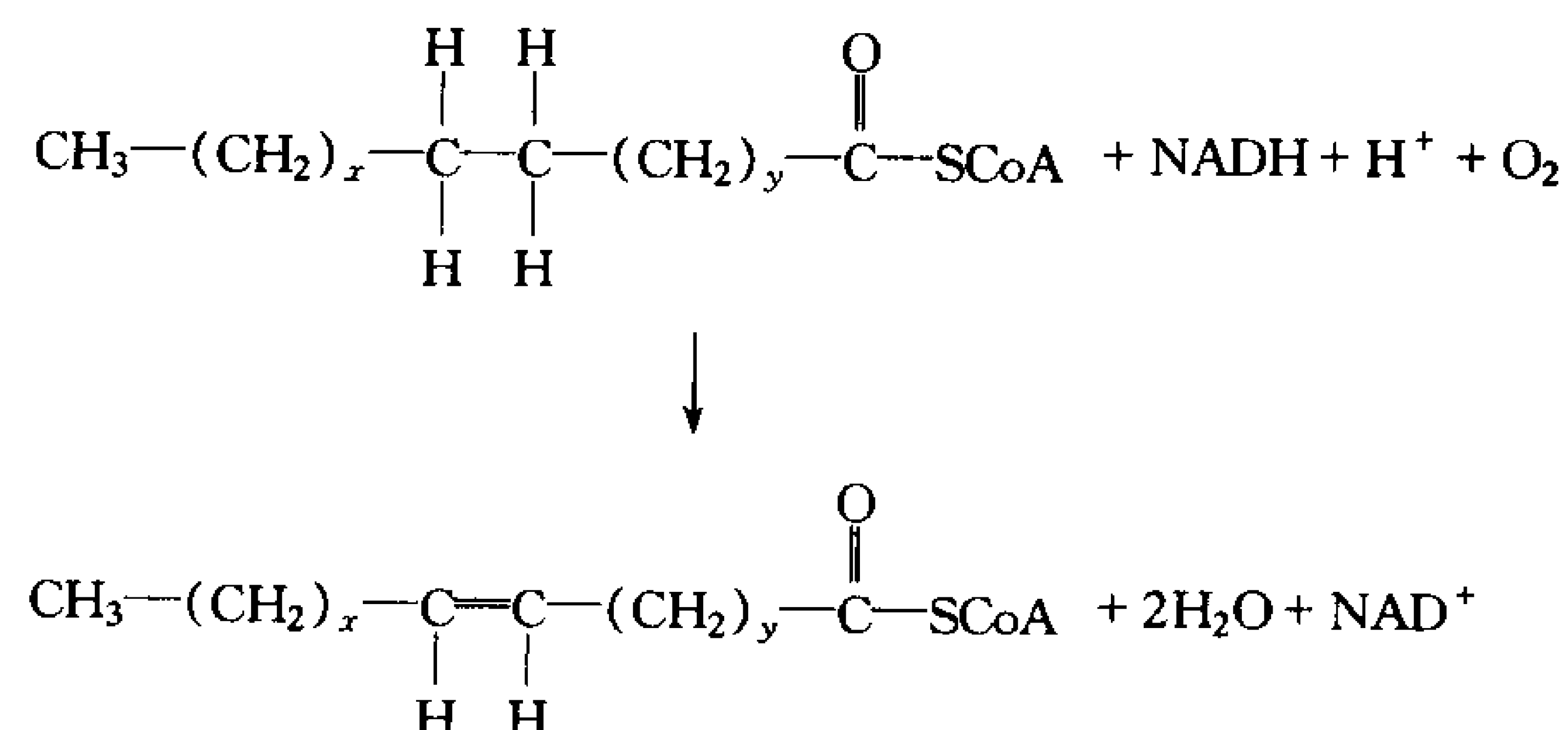
587

D. 延长酶和去饱和酶

棕榈酸(饱和的 C_{16}脂肪酸)被**延长酶**(elongase)和**去饱和酶**(desaturase)转化为更长链的饱和或不饱和脂肪酸。线粒体和内质网腔都含有延长酶，但两者的延伸机制不同。线粒体延长反应(不同于胞质中脂肪酸合成途径的过程)是在脂肪酸氧化的逆向过程中连续地添加和还原乙酰单位，这两个途径中惟一不同的化学反应在于最后一步还原反应中由 NADPH 代替 $FADH_2$ 作为氧化还原辅酶(图 19-24)。在内质网腔的延长反应包括一系列的丙二酸单酰 CoA 与酰基 CoA 的聚合反应。这些反应与脂肪酸合酶催化的反应相似，每个反应后都发生 NADPH-依赖性的还原反应，惟一不同的是脂肪酸是以 CoA 衍生物形式延长而不是以 ACP 衍生物形式。

不饱和脂肪酸是由**末端去饱和酶**(terminal desat-

urase)催化生成的。哺乳动物含有 4 种末端去饱和酶,有着不同的链长专一性,分别命名为 **Δ^9-、Δ^6-、Δ^5-和 Δ^4-脂酰-CoA 去饱和酶**,这些含非血红素铁的酶催化下列反应：　588



其中 $x \geqslant 5$ 和$(CH_2)_x$ 中可以包含一个或多个双键。底物$(CH_2)_y$ 部分总是饱和的。双键只能插入底物$(CH_2)_x$ 部位已有的双键和 CoA 基团之间,因此新双键比相邻双键离 CoA 基团要近 3 个碳原子(不与原有双键共轭)。在动物体内,双键的位置绝不低于 C9。

延长反应和去饱和反应联合进行可以合成一系列不饱和脂肪酸。然而,因为棕榈酸是动物体内可利用的最短的脂肪酸,上述原则使得亚油酸($\Delta^{9,12}$-十八碳二烯酸)的 Δ^{12}双键不能形成,而亚油酸是**前列腺素**(prostaglandins, 节 9-1F)的必需前体。因此亚油酸必需不断地从食物(最终来自于含有 Δ^{12}-和 Δ^{15}-去饱和酶的植物)中吸取,被称为**必需脂肪酸**(essential fatty acid)。事实上,若动物长期食用不含脂肪的食物,初始会出现生长不良,伤口难愈合及皮炎症状,最终导致死亡。亚油酸也是表皮鞘磷脂的一个重要组成成分,而鞘磷脂是皮肤保持水分的屏障,缺少亚油酸的动物要比那些有充足食物的动物饮用更多的水。

E. 三酰甘油的合成

三酰甘油是由脂酰 CoA 和甘油-3-磷酸或二羟丙酮磷酸合成的(图 19-25)。第一步反应是由线粒体和内质网中的**甘油-3-磷酸酰基转移酶**催化,或由内质网或过氧化物酶体中的**二羟丙酮磷酸酰基转移酶**催化。在后一种情况下,酰基二羟丙酮磷酸被 NADPH-依赖性还原酶催化,还原成相应的**溶血磷脂酸**(lysophosphatidic acid)。溶血磷脂酸再经 **1-酰基甘油-3-磷酸酰基转移酶**、**磷脂酸磷酸酶**和 **1,2-二酰基甘油酰基转移酶**连续作用,生成三酰甘油。中间体磷脂酸和 1,2-二酰基甘油也可以通过节 19-6A 描述的途径转化为磷脂。酰基转移酶对于各个脂酰 CoA 的链长或不饱和度均不具有严格的专一性,但人脂肪组织中的三酰甘油的棕榈酸倾向于连接在 1 位而油酸连接在 2 位。

至此,我们已经明白由二碳的乙酰基单位构建的脂肪酸再合成的三酰甘油是如何重新降解成乙酰基的。在肝脏中,产生的乙酰 CoA 可以被转化成酮体,以后再被其他组织重新转化为乙酰 CoA。然后乙酰 CoA 或被用来合成脂肪酸并以三酰甘油的形式储存,或被柠檬酸循环氧化再经氧化磷酸化释放大量的 ATP。我们应该看到,在三酰甘油合成或降解的代谢方向上,物质的流向取决于机体的能量需求和其他化合物,如膜脂(节 19-6)和胆固醇(节 19-7A)合成的需要。这些脂类代谢的重要特征总结在图 19-26 中。　590

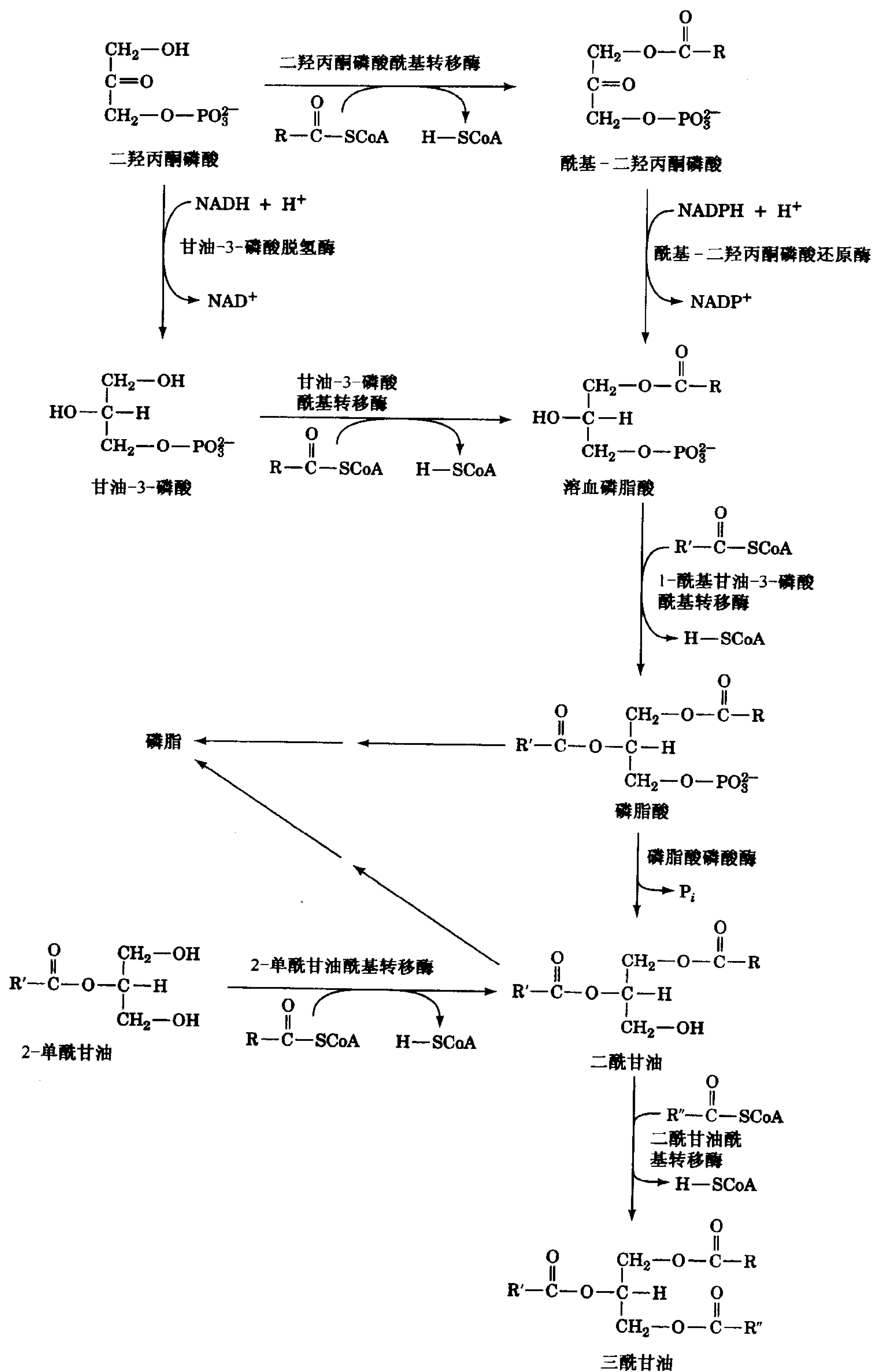


图 19-25 三酰甘油生物合成途径

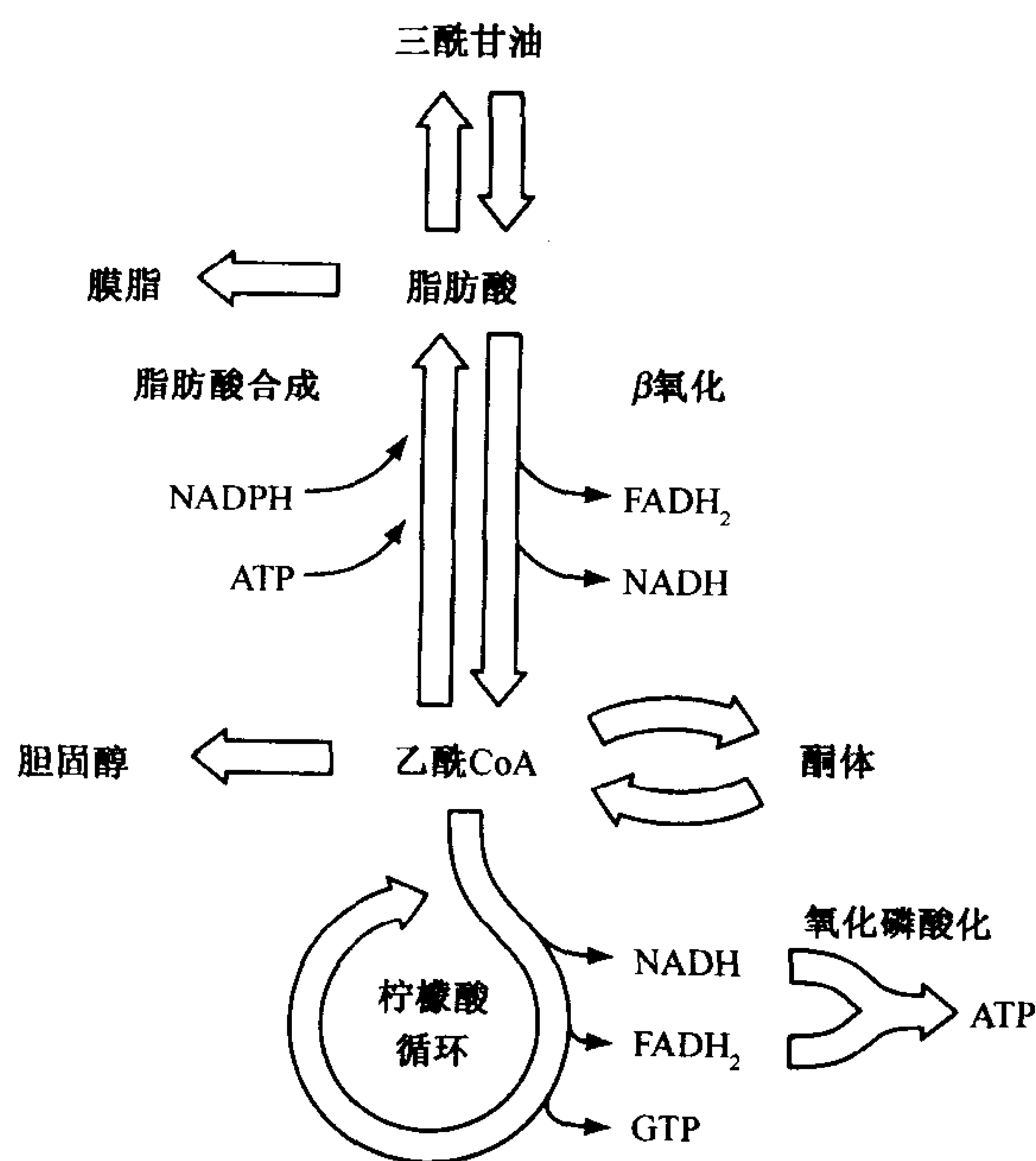


图 19-26　脂肪代谢的概述

5. 脂肪酸代谢的调节

代谢调节的讨论通常着眼于代谢途径是如何随生物体不同的能量需求和食物状况而作相应的变化。哺乳动物体内，糖原和三酰甘油是耗能过程的初级燃料，它们在食物充足时合成以备将来之用。在植物体内，淀粉和油类执行相似的功能（框 19-2）。

糖原和三酰甘油的合成和降解过程涉及整个有机体，生物的器官和组织通过血流形成相互依存的网络。血液运输产生能量所必需的代谢物：以乳糜微粒和 VLDL 形式存在的三酰甘油，以血清白蛋白复合物形式存在的脂肪酸、酮体、氨基酸、乳酸和葡萄糖。胰脏的 α 和 β 细胞根据生物体的食物和能量状况来调节血液中葡萄糖含量。当血糖浓度较低时（如饥饿状态）α 细胞分泌胰高血糖素，而当血糖浓度升高时（如进食后）β 细胞分泌胰岛素。我们已经知道这些激素是如何影响糖原代谢的（节 15-3C）。它们也能双向调节脂代谢途径的速率进而控制脂肪酸或被氧化或被合成。其主要的调控机制总结于图 19-27。

脂肪酸氧化过程主要由血液中的脂肪酸浓度调节，而该浓度反之又受脂肪组织中**激素敏感性三酰甘油脂酶**催化的三酰甘油水解速率控制。之所以这样称谓这个酶是因为它能够依据激素调控的 cAMP 水平进行灵敏的磷酸化或去磷酸化调节。胰高血糖素、前列腺素和去甲肾上腺素可以提高脂肪组织中 cAMP 浓度。cAMP 别构激活 cAPK，cAPK 再磷酸化特定的酶。磷酸化的酶激活激素敏感性脂酶，进而刺激脂肪组织中的脂肪脂解，提高血液脂肪酸水平，最终激活其他组织如肝脏和肌肉中的 β-氧化途径。在肝脏中，这个过程导致酮体产生并分泌入血液运送到外周组织代替葡萄糖燃料。cAPK 还能使乙酰 CoA 羧化酶失去活性（节 19-4B），因此 cAMP-依赖性磷酸化作用可以同时激活脂肪酸氧化和抑制脂肪酸合成。

591
592

框 19-2 生物化学相关内容

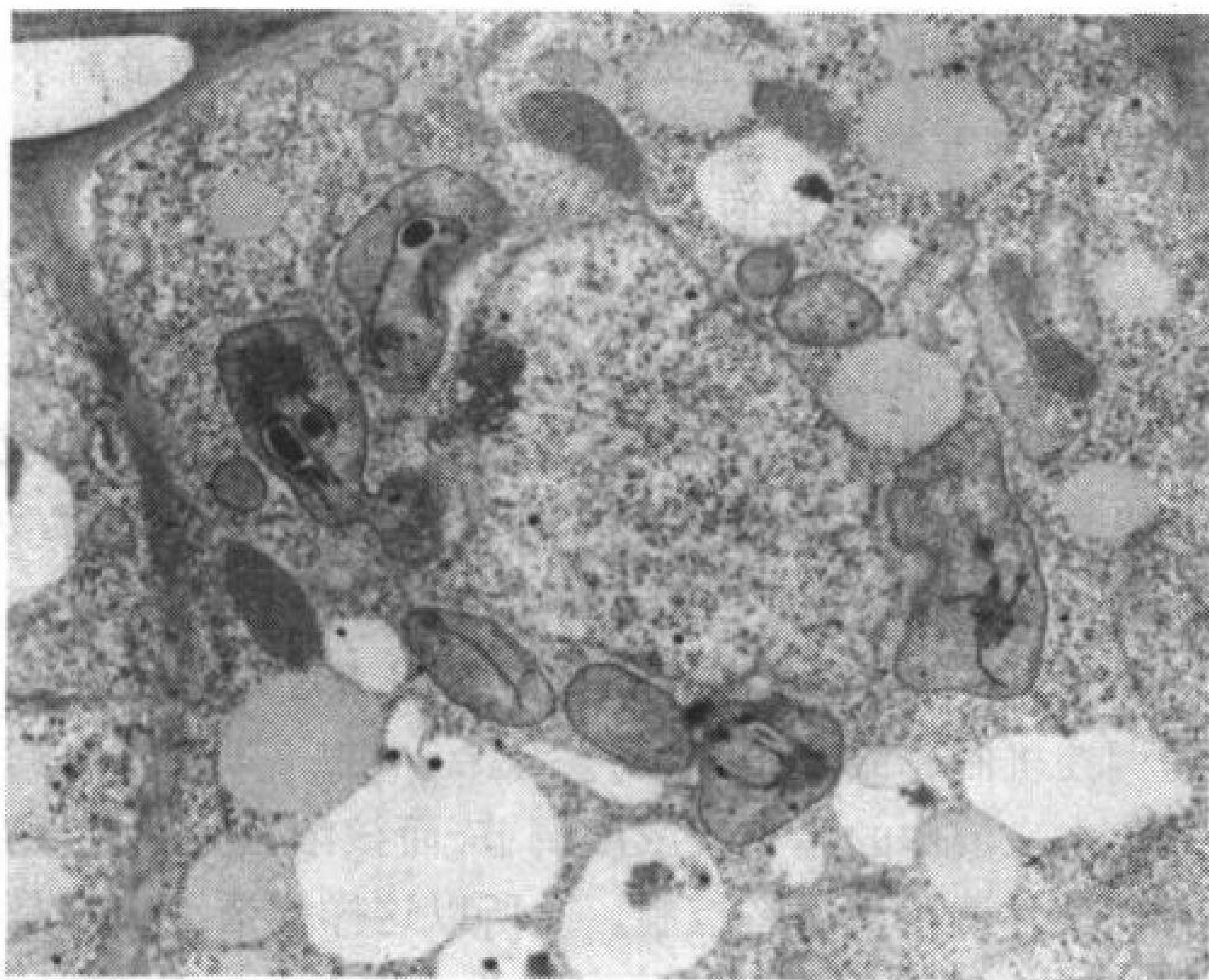
植物油脂

植物含有较动物脂肪液化温度低的三酰甘油，这些油脂同脂肪一样，仍然具有代谢燃料储备的功能。在种子中，油脂与碳氢化合物和蛋白质的比例变动很大，例如在小麦是 1%～2%，而在蓖麻籽约为 60%。大量的脂质不是像动物脂肪细胞那样以单个液滴储存，而是形成直径约为 1μm 的**油脂体**(oil bodies)(在光镜下，呈灰色颗粒，透明的区域是液泡，而深色的颗粒是各种亚细胞器。)

每个种子可能含有超过 2000 个油脂体，它们被含有蛋白质的脂单层所围绕，因此类似于血清脂蛋白。发芽期间，脂酶转变油脂成脂肪酸用于 β 氧化。产生的乙酰 CoA 能够进一步经由柠檬酸循环被氧化产生能量，或者经由乙醛酸途径转化为碳氢化合物(节 16-5C)。

植物脂膜含有的脂肪酸的类型相对来说少些，但是油脂成分在脂酰链长度、不饱和程度和存在像羟基或环氧基这样的功能基团方面有多得多的可变性。因为植物油脂广泛用于烹饪和工业应用上，负责其合成的酶已经成为可被考虑的研究和操作的靶。世界收获的植物油脂有大约三分之一被用于制造润滑剂。这些产品的生物资源比石化资源往往较为廉价并且更可再生。对涉及植物脂质代谢的酶学机制的了解，有助于改造油脂产品或设计新的油脂品种。例如，通过把酵母硬脂酰 CoA 去饱和酶的基因导入植物，就可能工程化生产改善了营养价值的植物油(如更高含量的多不饱和脂酰链)。同样地，通过抑制去饱和酶的活性减少双键的含量，提高油的稳定性(更耐受氧化)。另外像这样的基因工程途径可能有把握比现行化学氢化方法成本更低。

植物脂质工程的许多发展业已采用哺乳动物或酵母酶和熟知的实验室实验材料如烟草植物。不过，具有成本优势的工程植物油的产生尚需要对植物脂质代谢和产生高油含量种子的植物有更多的了解。



(photo courtesy of Richard Trelease, Arizona State University.)

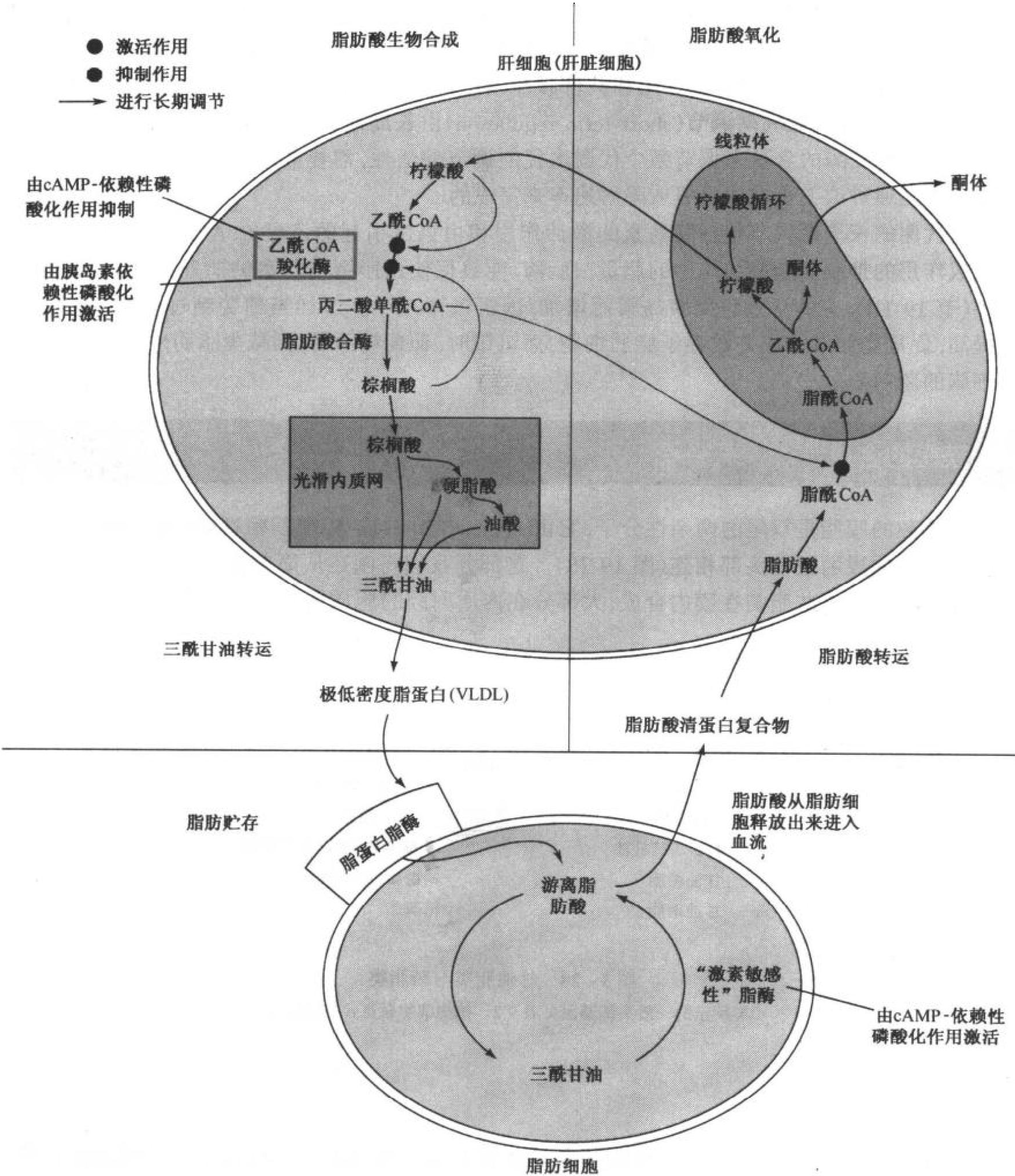


图 19-27　脂肪酸代谢的调控位点

胰岛素的效应与胰高血糖素和肾上腺素相反:它促进糖原和三酰甘油的合成。胰岛素降低 cAMP 水平,导致去磷酸化作用进而抑制激素敏感性脂酶的活性。这样减少了可用于氧化的脂肪酸数量。胰岛素还能激活乙酰 CoA 羧化酶(节 19-4B)。*所以胰高血糖素:胰岛素的比率决定了脂肪酸代谢的速率和方向。*

当脂肪酸合成被激活时，另一个抑制脂肪酸氧化的机制是丙二酸单酰 CoA 抑制肉碱棕榈酰转移酶 I 的活性，使新合成的脂肪酸堆积于线粒体外(节 19-2B)而远离 β 氧化系统。

底物的可利用性、变构相互作用和共价修饰(磷酸化)等因素可以在数分钟甚至更短时间内调节酶的活性，这种**短周期调节**(short-term regulation)由**长周期调节**(long-term regulation)补充，后者是通过改变酶的含量来调节某个代谢途径的调节酶活性，需要数小时或数天的时间。这种调节方式是通过改变蛋白质合成或降解速率来完成的。

脂代谢的长周期调节包括胰岛素的激活作用和由饥饿引起的乙酰 CoA 羧化酶和脂肪酸合酶合成作用的抑制。脂肪组织中的脂蛋白脂酶，能够促使由脂蛋白包裹的脂肪酸进入脂肪组织贮存(节 19-1B)，它的含量也因胰岛素而增加，因饥饿而减少。这样当葡萄糖过多时，胰岛素水平提高，促进脂肪酸合成并贮存于脂肪细胞，而饥饿时，葡萄糖不足，则减少脂肪酸合成而动用脂肪细胞的脂肪酸。

6. 膜脂的合成

大多数的膜脂是双尾的两亲性分子，它由 1,2-二酰甘油或 *N*-酰基鞘氨醇(神经酰胺)与一个糖或磷酸脂构成的极性头部相连(图 19-28)。这部分我们将阐述从简单化合物合成这些复合脂类的生物过程。这些脂类在膜内合成，大部分在内质网腔的胞质面合成并以囊泡形式转运至胞内最终位点(节 10-2C)。

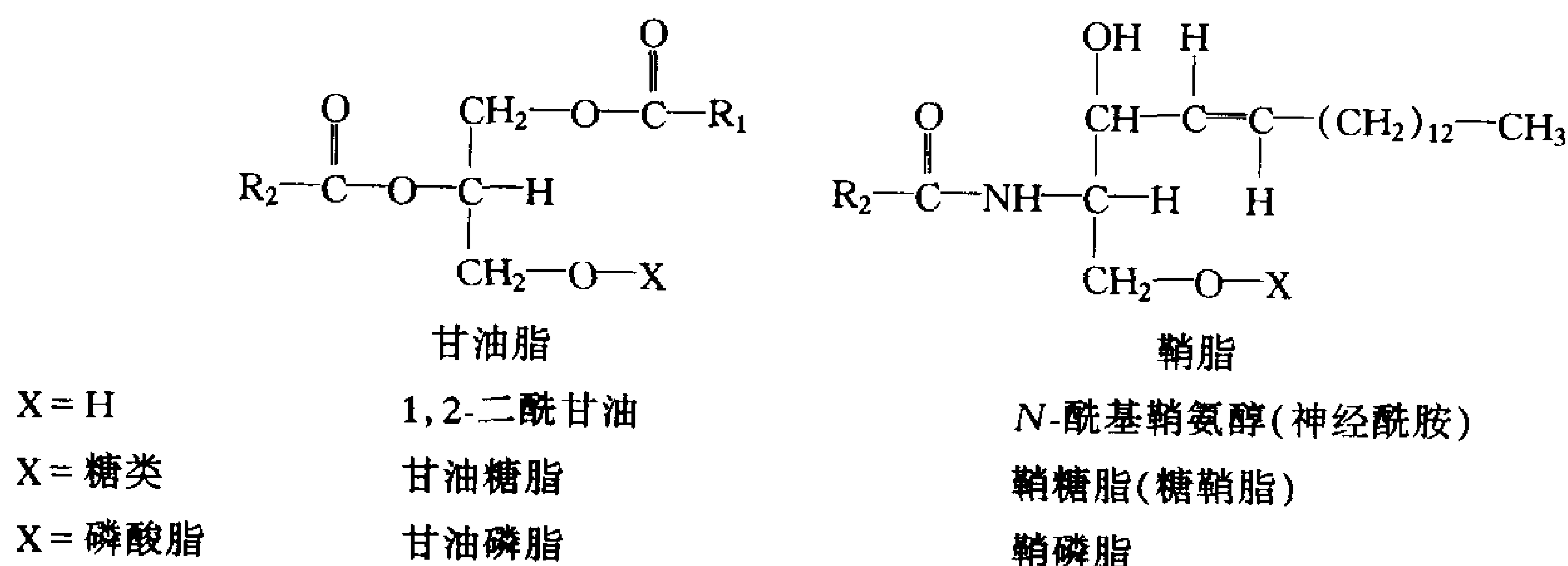


图 19-28 甘油脂类与鞘脂类

X 所示的一般头部基团见表 9-2。植物细胞膜富含甘油糖脂。

A. 甘油磷脂类

甘油磷脂的 C1 和 C2 连接的脂酰基有显著的不对称性：C1 上的取代基大多数是饱和脂肪酸，而 C2 上通常是长链不饱和脂肪酸。

594

二酰甘油磷脂的生物合成

三酰甘油的前体 1,2-二酰甘油和磷脂酸也是甘油磷脂的前体(图 19-25)。甘油磷脂的极性头部基团通过磷酸二酯键与甘油的 C3 相连。在哺乳动物内，头部基团**乙醇胺**(ethanolamine)和**胆碱**(choline)与脂连接前首先被活化(图 19-29)。

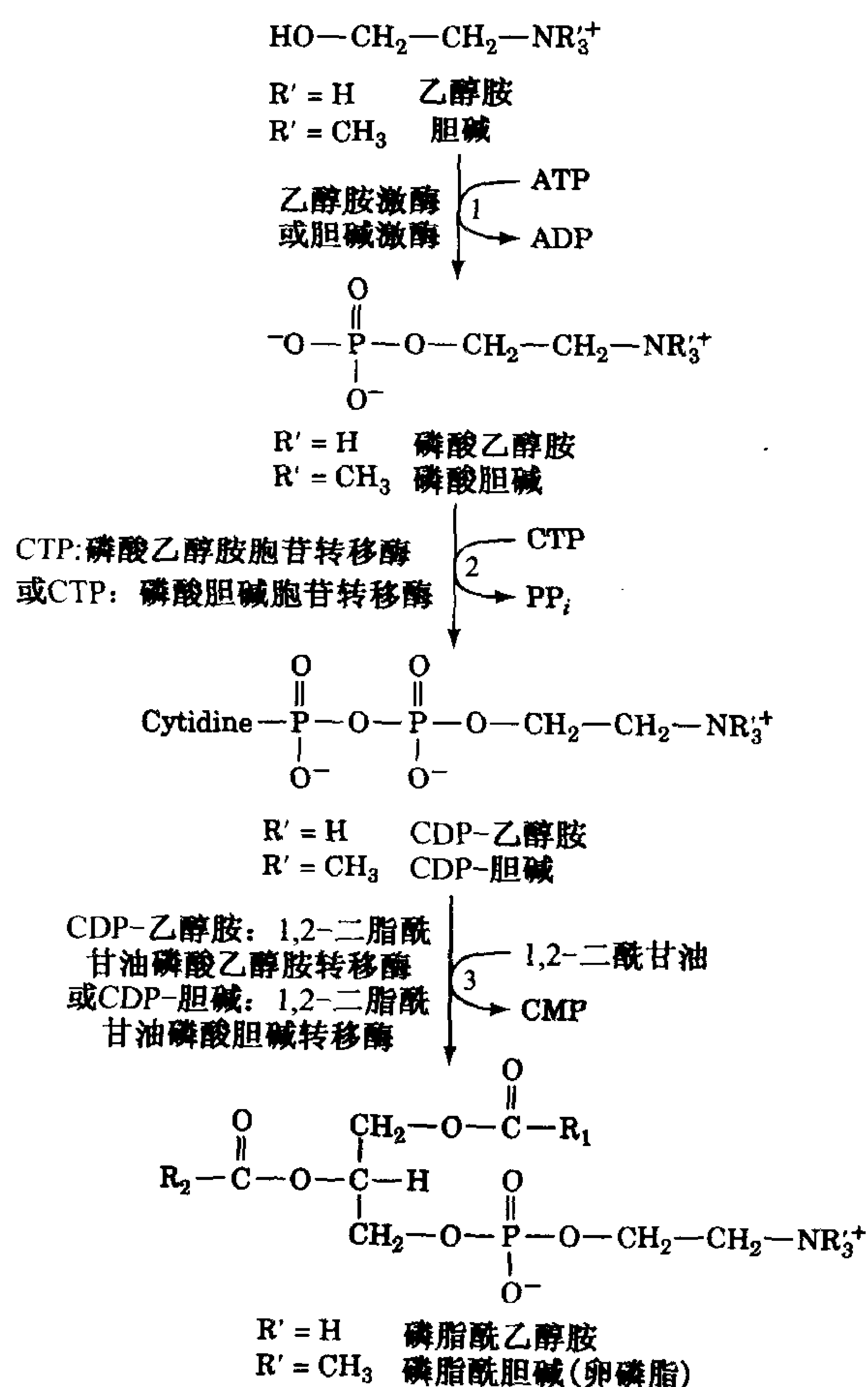


图 19-29 磷脂酰乙醇胺与磷脂酰胆碱的生物合成

在哺乳动物中，CDP-乙醇胺与 CDP-胆碱是头部基团的前体。

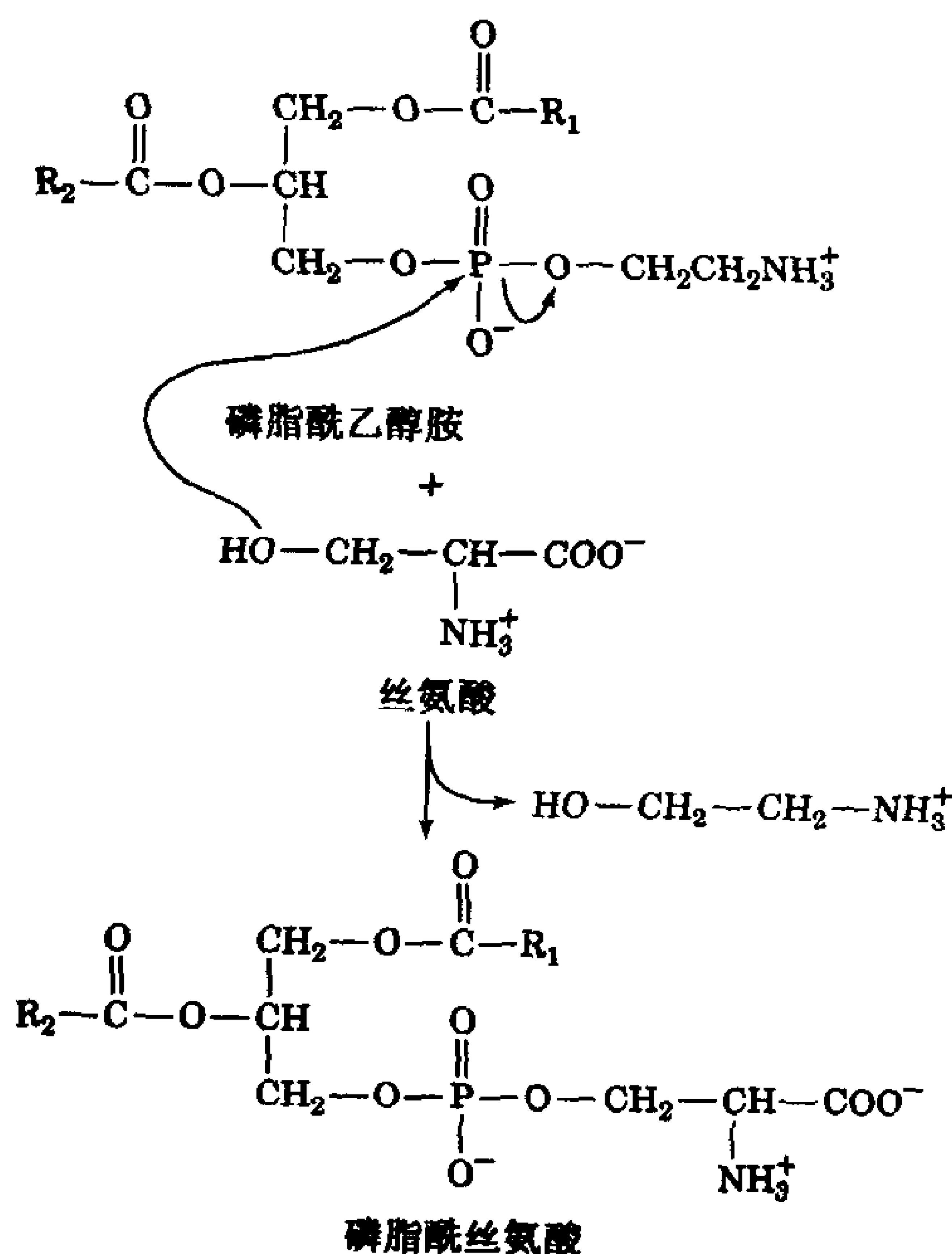
1）ATP 磷酸化胆碱或乙醇胺的 OH 基。

2）形成的**磷酸乙醇胺**(phosphoethanolamine)或**磷酸胆碱**(phosphocholine)的磷酰基团攻击 CTP，释放 PP_i，形成相应的 CDP 衍生物，它是极性头部基团活化了的磷酸脂。

3）1，2-二酰甘油的 C3 OH 攻击活化的 CDP-乙醇胺或 CDP-胆碱的磷酰基团，取代 CMP 生成相应的甘油磷脂。

在肝脏里，磷脂酰乙醇胺可通过甲基化转化为磷脂酰胆碱。

磷脂酰丝氨酸(phosphatidylserine)是由磷脂酰乙醇胺通过**磷脂酰乙醇胺转移酶**催化的头部基团交换反应生成，反应中 Ser 的 OH 基攻击供体的磷酰基团。移去原来的头部基团，形成磷脂酰丝氨酸。



在**磷脂酰肌醇**(phosphatidylinositol)和**磷脂酰甘油**(phosphatidylglycerol)的合成过程中，疏水性尾巴

被活化而不是极性头部。1,2-二酰甘油(图 19-25)的前体磷脂酸,攻击 CTP 的 α-磷酸基团形成活化的 **CDP-二酰甘油**(CDP-diacylglycerol)和 PP_i(图 19-30)。磷脂酰肌醇是由肌醇与 CDP-二酰甘油反应生成。磷脂酰甘油由两步反应生成:① 甘油-3-磷酸的 C1OH 基团攻击 CDP-二酰甘油,生成**磷脂酰甘油磷酸**(phosphatidylglycerol phosphate);② 磷酰基水解生成磷脂酰甘油。

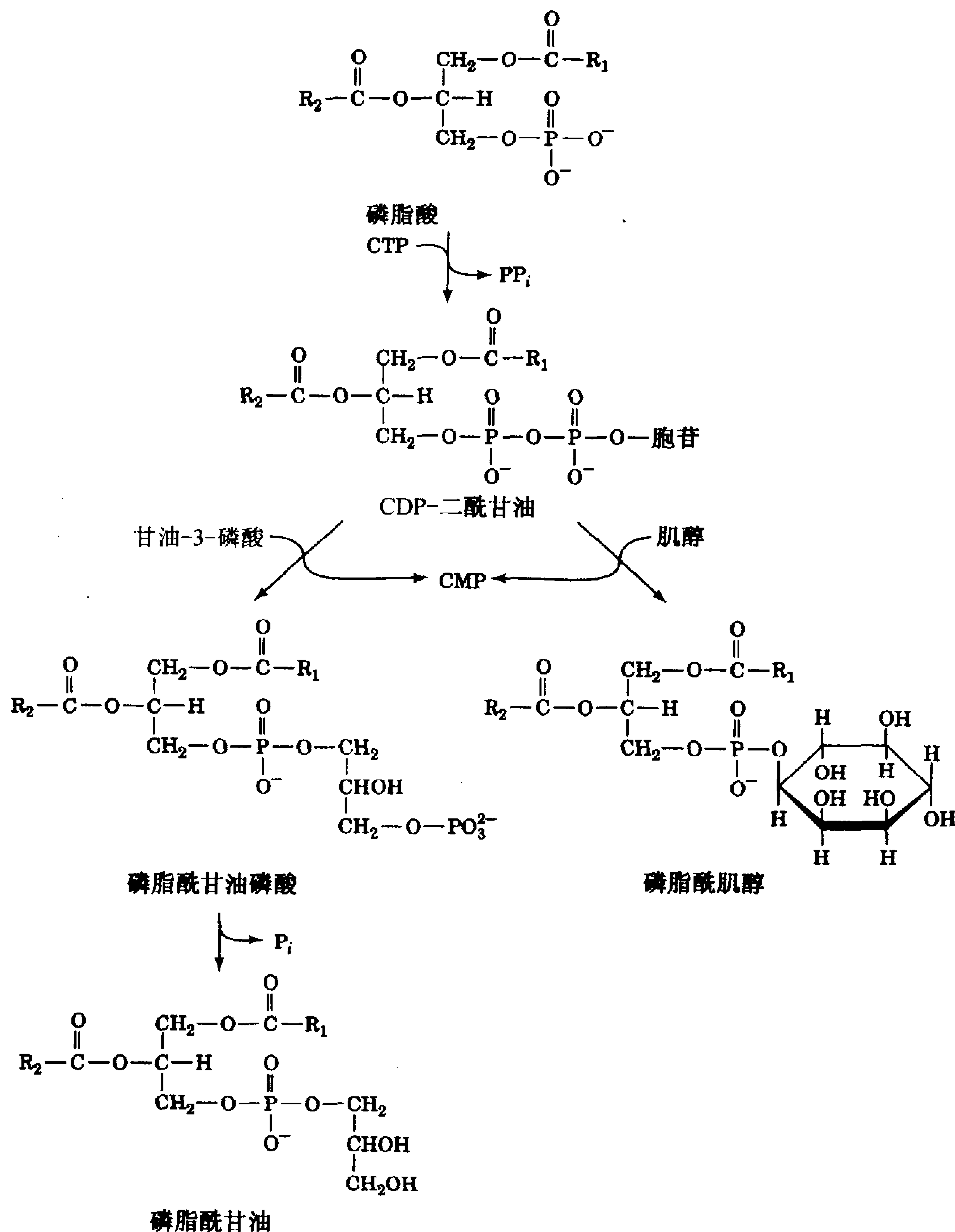


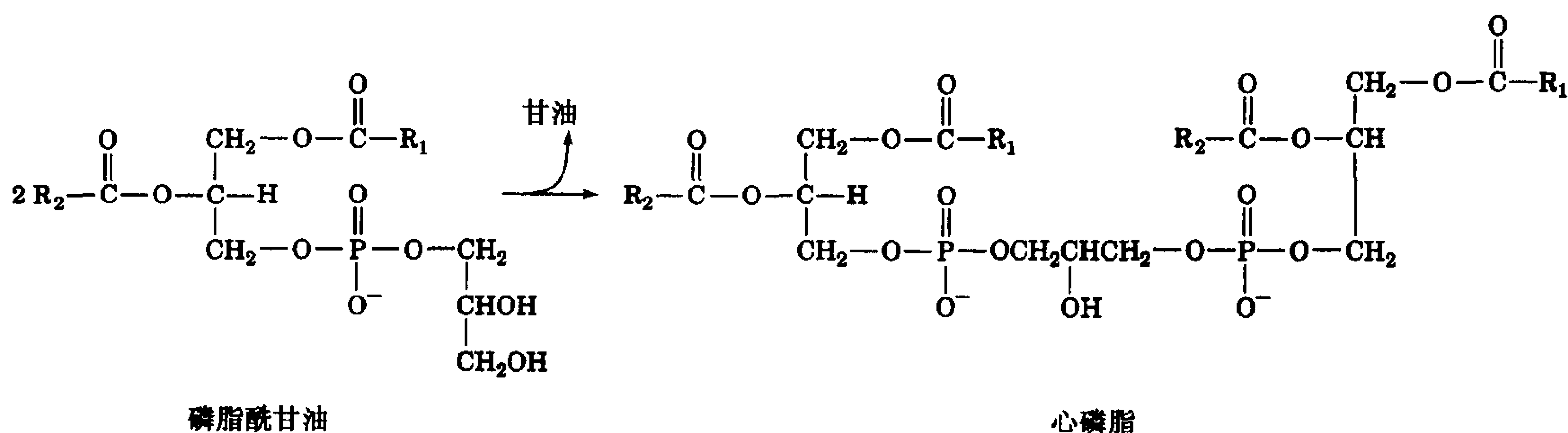
图 19-30 磷脂酰肌醇与磷脂酰甘油的生物合成

在哺乳动物中,该过程涉及一个 CDP-二酰甘油中间体。

心磷脂是由两分子磷脂酰甘油缩合去除一分子甘油后形成。

合成磷脂酸的酶一般倾向于将饱和脂肪酸连在 C1 位,而将不饱和脂肪酸连在 C2 上,然而也有例外,例如约 80% 的脑磷脂酰肌醇在 C1 上有一条硬脂酰基(18:0),在 C2 上有一花生四烯酰基(20:4)。而约 40% 的肺磷脂酰胆碱在两个位置上都有棕榈酰基(16:0)(磷脂酰胆碱是表面

596

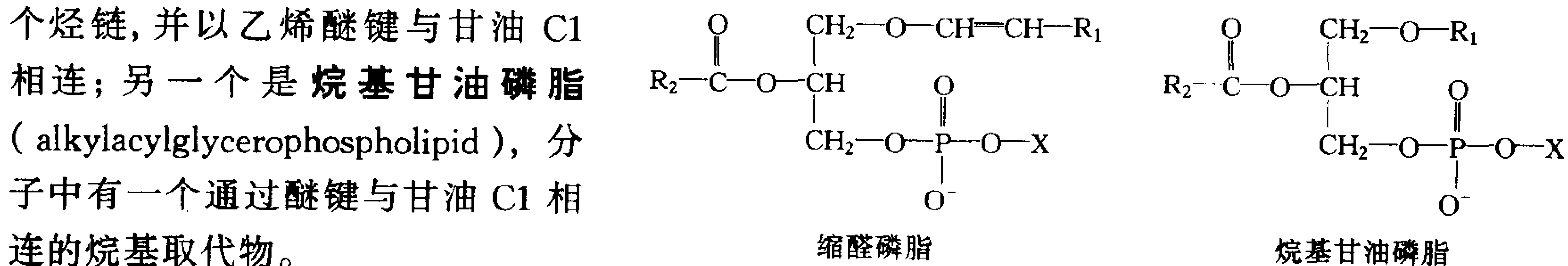


活性剂的主要成分,当肺呼出气体时,它可避免肺萎缩;早产婴儿因缺乏该物质而患呼吸困难综合症;框 9-1)。William Lands 证实这种侧链专一性来自于由特异的磷脂酶和酰基转移酶催化的“重建”反应,在此反应中特定的甘油磷脂的特异酰基被交换。

缩醛磷脂和烷基甘油磷脂的生物合成

597

真核生物膜还含有相当数量的两种其他类型的甘油磷脂:**缩醛磷脂**(plasmalogen),它含有一个烃链,并以乙烯醚键与甘油 C1 相连;另一个是**烷基甘油磷脂**(alkylacylglycerophospholipid),分子中有一个通过醚键与甘油 C1 相连的烷基取代物。



大约 20% 的哺乳动物甘油磷脂是缩醛磷脂,但在不同个体或同一个体不同组织中的百分率也不尽相同。例如,在人的肝脏中缩醛磷脂仅占磷脂的 0.8%,而在神经组织中却占 23%。烷基甘油磷脂含量比缩醛磷脂更低。缩醛磷脂和烷基甘油磷脂之间的前体 - 产物相关性已通过 ^{14}C 示踪研究确定(节13-4A)。烷基甘油磷脂首先被合成,然后再由去饱和酶催化氧化成乙烯醚。

B. 鞘脂类

大多数鞘脂类是**鞘糖脂**(sphingoglycolipid),即它们的极性头部由糖单位构成。脑苷脂是神经酰胺单糖,而神经节苷脂是含有唾液酸的神经酰胺寡糖(节 9-1D)。这些脂类是由糖单位与神经酰胺(*N*-酰基鞘氨醇)的 C1 OH 基相连而合成。

N-酰基鞘氨醇是通过四步反应从前体棕榈酰 CoA 和丝氨酸合成的(图 19-31)。

1) **3-酮二氢鞘氨醇合酶**催化棕榈酰-CoA 与 Ser 聚合生成 **3-酮二氢鞘氨醇**(3-ketosphinganine)。

2) **3-酮二氢鞘氨醇还原酶**催化 3-酮二氢鞘氨醇的酮基进行 NADPH 依赖性的还原反应形成**二氢鞘氨醇(二氢神经鞘氨醇)**。

3) 将酰基 CoA 上的酰基转移至二氢鞘氨醇的 2-氨基上,形成酰胺键,生成**二氢神经酰胺**(dihydroceramide)。

4) **二氢神经酰胺还原酶**通过 FAD-依赖性氧化反应将二氢神经酰胺转化为神经酰胺。

$CoA-S-C(=O)-CH_2-CH_2-(CH_2)_{12}-CH_3 + H_2N-CH(CO_2^-)-CH_2OH$

棕榈酰 CoA 丝氨酸

1 3-酮二氢鞘氨醇合酶 → CO_2^- + CoASH

$H_2N-CH(CH_2OH)-C(=O)-CH_2-CH_2-(CH_2)_{12}-CH_3$

3-酮二氢鞘氨醇
(3-酮二氢神经鞘氨醇)

2 $NADPH + H^+$ 3-酮二氢鞘氨醇还原酶 → $NADP^+$

$H_2N-CH(CH_2OH)-CH(OH)-CH_2-CH_2-(CH_2)_{12}-CH_3$

二氢鞘氨醇
(二氢神经鞘氨醇)

3 $R-C(=O)-SCoA$ 酰基CoA转移酶 → CoASH

$R-C(=O)-NH-CH(CH_2OH)-CH(OH)-CH_2-CH_2-(CH_2)_{12}-CH_3$

二氢神经酰胺
(N-酰基二氢神经鞘氨醇)

4 FAD 二氢神经酰胺还原酶 → $FADH_2$

$R-C(=O)-NH-CH(CH_2OH)-CH(OH)-CH=CH-(CH_2)_{12}-CH_3$

神经酰胺
(N-酰基神经鞘氨醇)

图 19-31 神经酰胺(N-酰基神经鞘氨醇)的生物合成

$R-C(=O)-NH-CH[CH(OH)-CH=CH-(CH_2)_{12}-CH_3]-CH_2-O-P(=O)(O^-)-O-CH_2-CH_2-\overset{+}{N}(CH_3)_3$

鞘磷脂

非甘油脂——鞘磷脂是神经细胞膜的重要成分。它是磷脂酰胆碱的磷酰胆碱基团转移至 *N*-酰基鞘氨醇的 C1 OH 基上形成的。

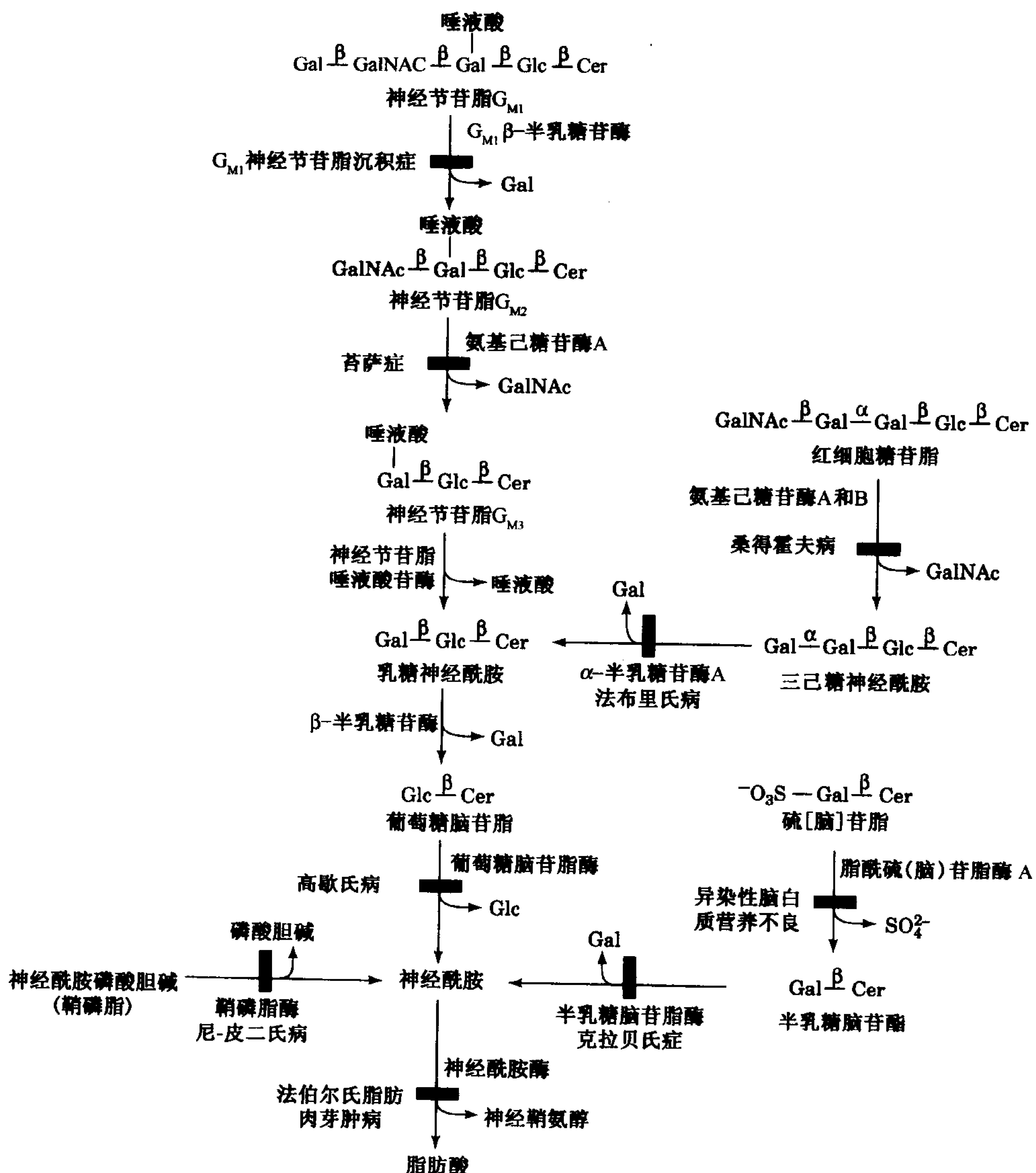
脑苷脂(多数是 1-β-半乳糖脑苷脂或 1-β-葡萄糖脑苷脂)是将相应的 UDP-己糖的糖基转到神经酰胺的 C1 OH 上形成的。神经节苷脂更加复杂的头部基团则是通过一系列糖基转移酶的作用而形成。合成反应开始于 UDP-半乳糖的半乳糖基转移到葡萄糖脑苷脂形成 β(1→4)键(图 19-32)。因为这个键和乳糖中葡萄糖和半乳糖的连接键相同,这个糖脂经常被称为**乳糖神经酰胺**(lactosyl ceramide)。乳糖神经酰胺是神经节苷脂和**红细胞糖苷脂**((globoside)中性神经酰胺寡糖)的前体。形成红细胞糖苷脂时,一个半乳糖基和一个 *N*-乙酰半乳糖胺基(GalNAc)依次从 UDP-Gal 和 UDP-GalNAc 加到乳糖神经酰胺分子上。G_M 神经节苷脂(图 9-9)则是将来源于 CMP-NANA 的 ***N*-乙酰神经氨酸(NANA,唾液酸)**加到乳糖神经酰胺上,生成 G_{M3}。随后 *N*-乙酰半乳糖胺和半乳糖基加到 G_{M3} 上生成神经节苷脂 G_{M2} 和 G_{M1},其他神经节苷脂是通过一系列不同的糖基转移反应而合成。这些复杂脂类降解途径的障碍会导致某些脂类储存性疾病(框 19-3)。

N-乙酰神经氨酸
(NANA,唾液酸)

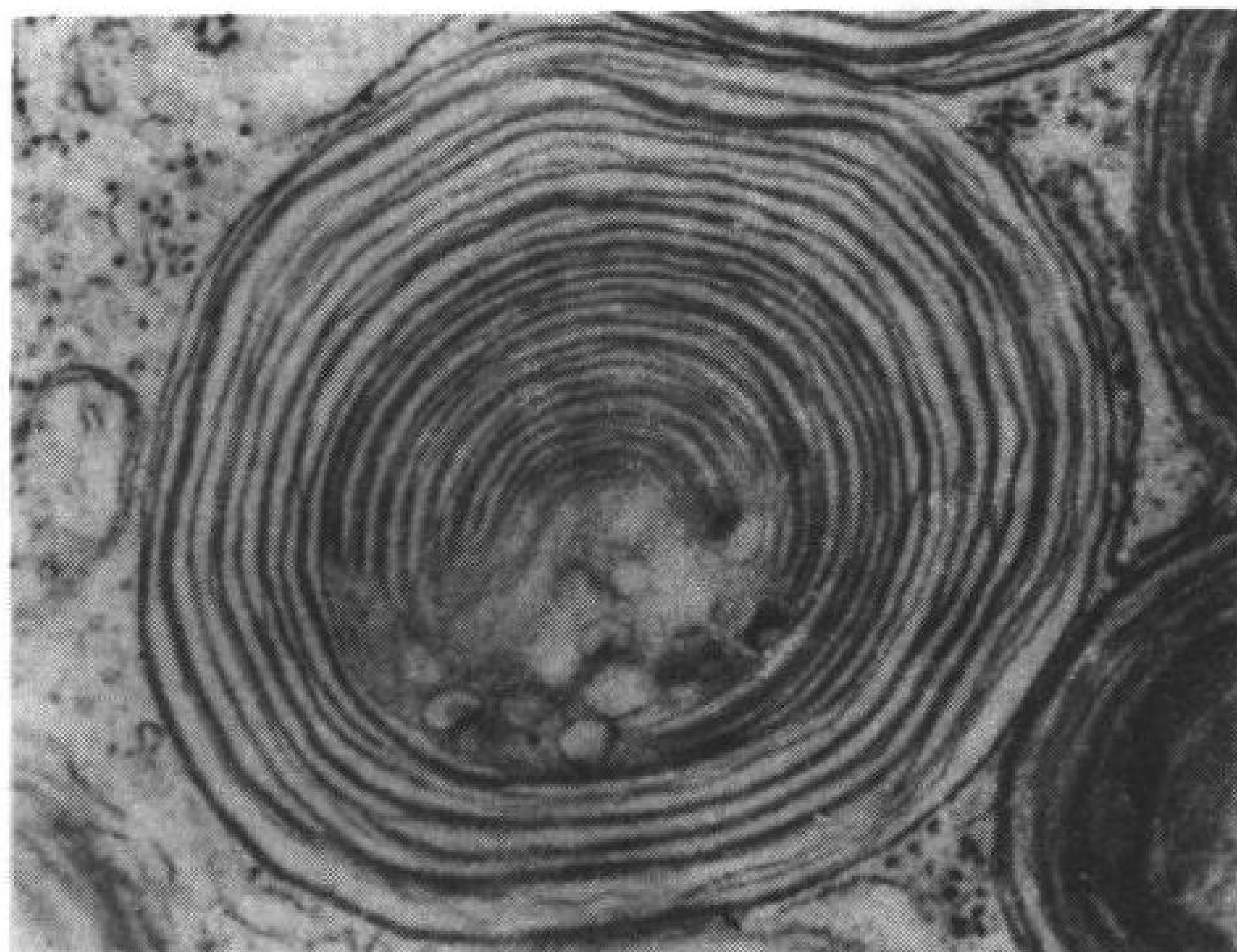
框 19-3　健康和疾病中的生物化学

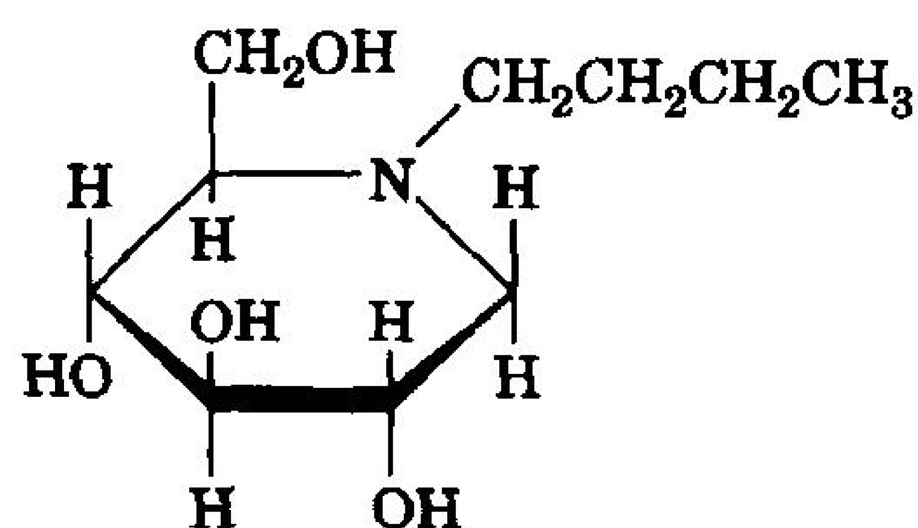
鞘脂降解和脂储存疾病

鞘糖脂被溶酶体降解要经历一系列的酶介导水解反应(见下面)。



酶中的任一个(红杆标明)产生遗传缺陷,就导致鞘脂储存症,丢失的酶的底物就积累而且往往伴随灾难性后果。在许多病案中,患者患精神障碍,并且在胎儿或早幼儿就死亡。最常见的一种脂质储存症是苔萨症,一种常染色体隐性的氨基己糖苷酶缺陷,该酶从神经节苷脂 G_{M2}水解下 *N*-乙酰半乳糖胺,缺少氨基己糖苷酶活性,导致 G_{M2}的累积,在神经元细胞内形成壳样包含体。





N-丁酰脱氧野尻霉素

虽然患有苔萨症的婴儿刚生下来时看起来似乎正常，1 岁左右当 G_{M2}大量积累，干扰神经元功能时，他们逐渐变得虚弱，有障碍和失明，通常到 3 岁时死亡。不过借助简单的血清检测，是有可能筛选到这一疾病的潜在患者。

利用苔萨症小鼠模型做的实验表明，可以通过抑制 G_{M2}的合成减少它的积累。其作法是给小鼠饲服 *N*-丁酰脱氧野尻霉素，该药在葡糖神经酰胺合成的第一步抑制糖基转移酶。在治疗其他脂质储存症，尤其是当有缺陷但是基本的酶还残留一定活性时，类似的"底物排除"途径可能也是有疗效的。

(Photo courtesy of John S. O'Brien, University of California at San Diego)

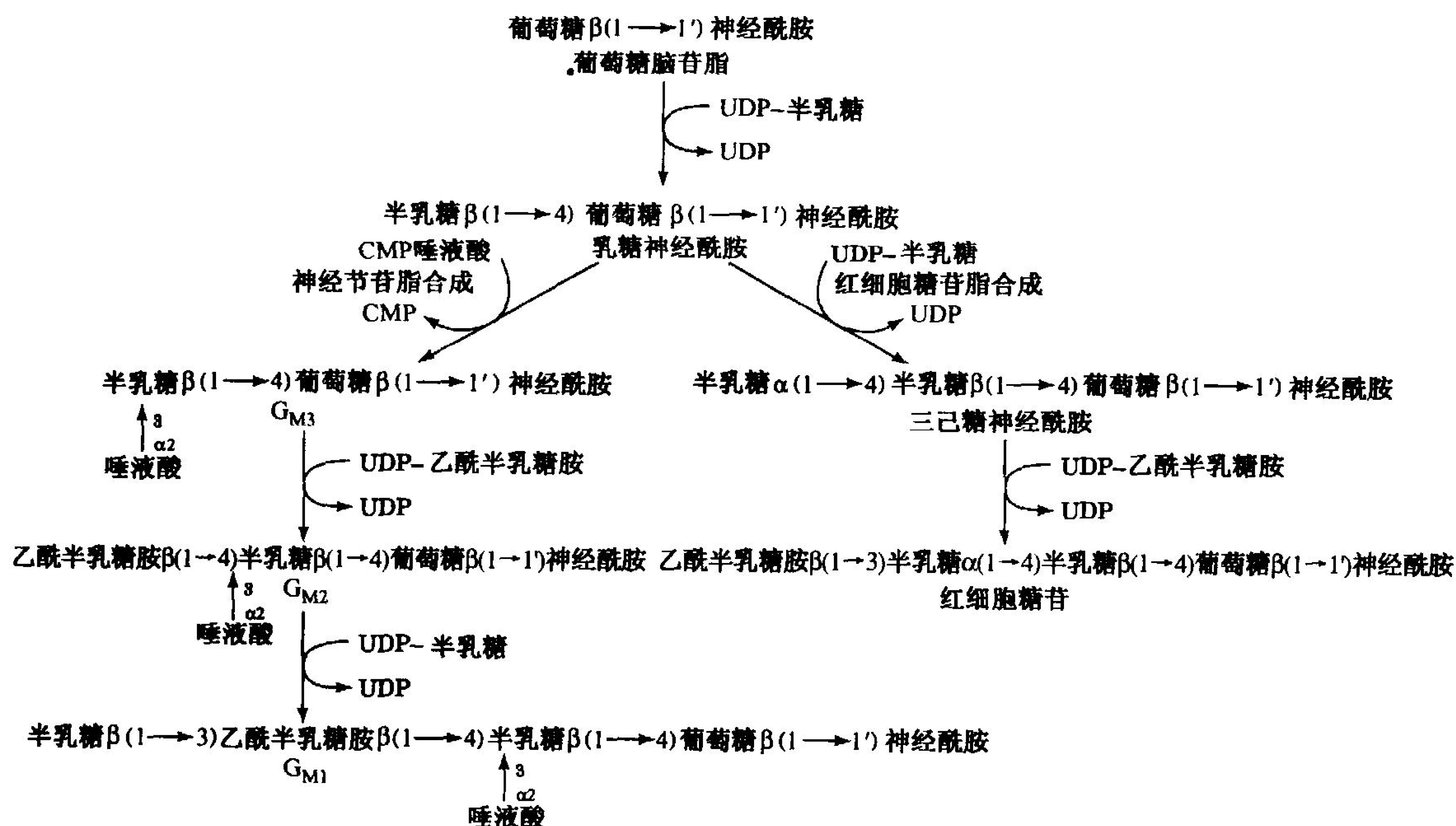


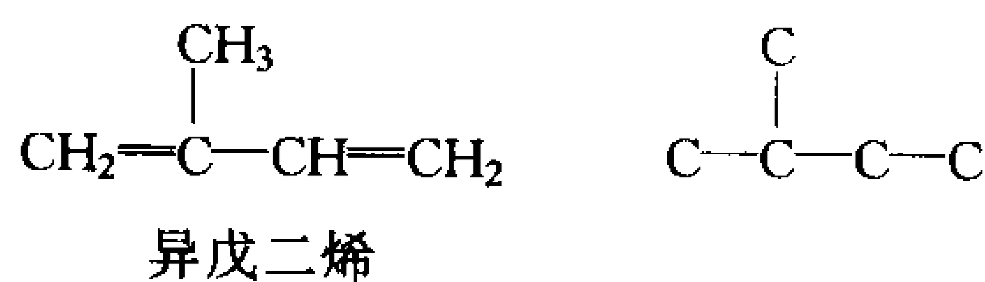
图 19-32 红细胞糖苷与 G_M 神经节苷脂的生物合成

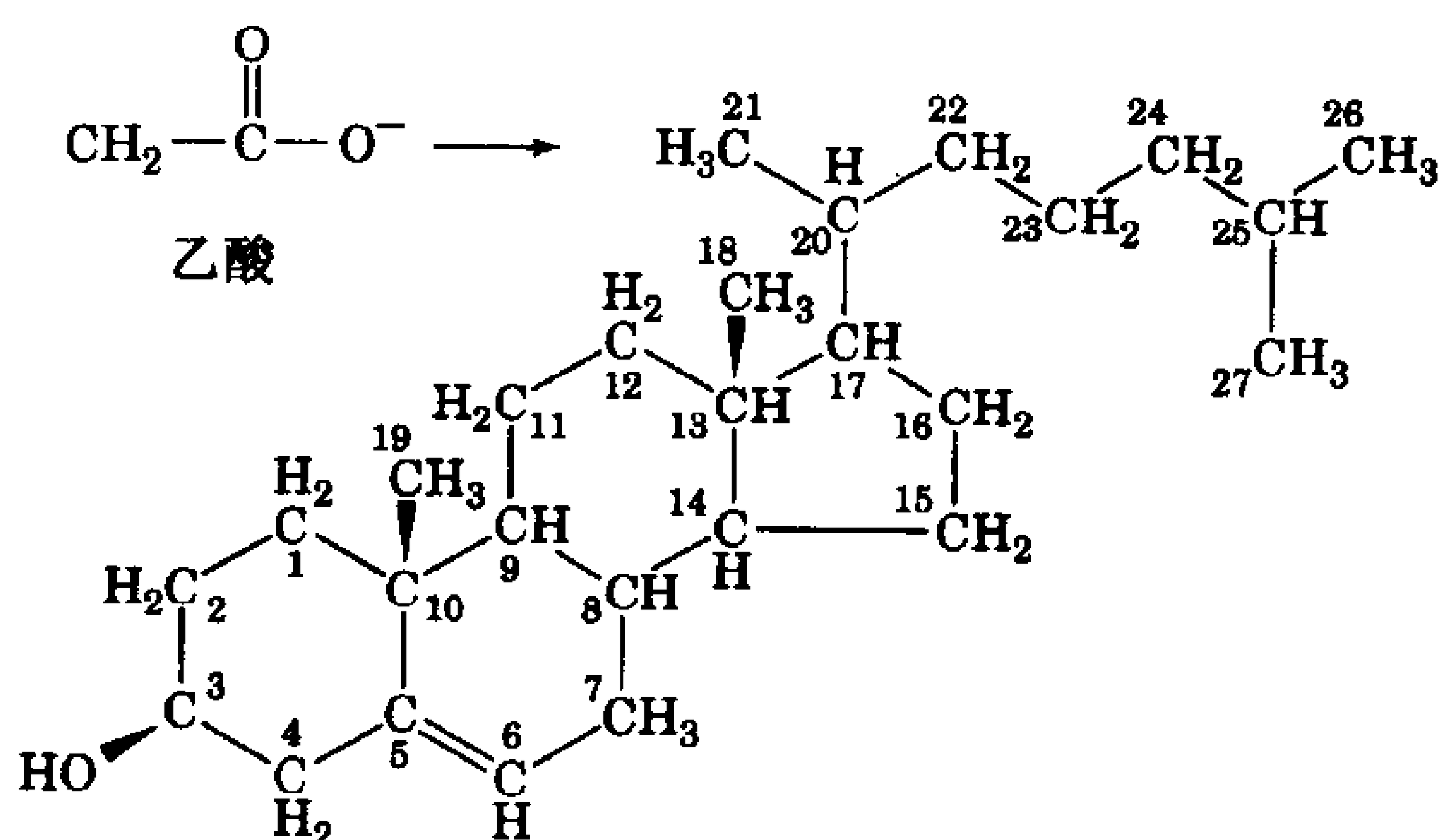
7. 胆固醇的代谢

胆固醇是细胞膜的重要组分，也是固醇类激素和胆汁酸的前体，对于生命有非常重要的作用。然而它在动脉里沉积会引发心血管疾病及中风，这是导致人类死亡的两大祸首。在健康的生物体内，胆固醇的合成、利用、转运之间保持着精细的平衡，尽量减少它的有害积累。这部分我们将讨论胆固醇的生物合成、转运及调节。

A. 胆固醇的生物合成

同位素标记实验表明胆固醇的所有碳原子都来源于乙酸。胆固醇生物合成经过一复杂过程。Konrad Bloch 首先提出，在此过程中乙酸先转化为**异戊二烯单位**[它有**异戊二烯**(isoprene)的碳骨架]，



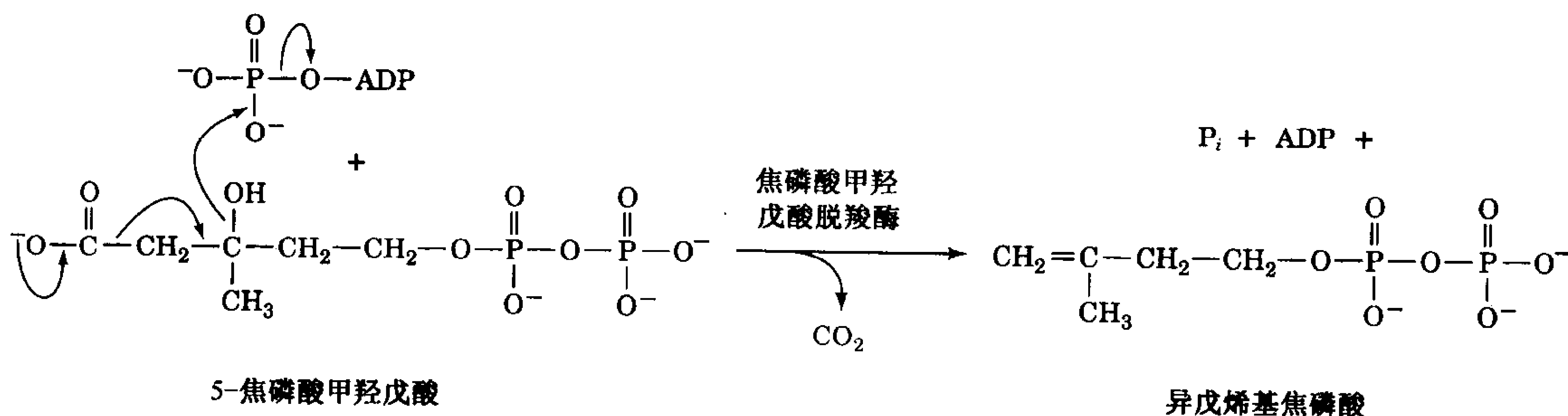


异戊二烯单位再聚合形成 30 个碳原子的线性分子，然后再环化形成胆固醇的 4 个环状结构。

HMG-CoA 是重要的胆固醇前体

乙酰 CoA 通过一系列反应转化为异戊二烯单位，第一步反应是形成羟基甲基戊二酸单酰 CoA(HMG-CoA；该化合物也是酮体合成的中间体；图 19-17)。HMG-CoA 合成需要硫解酶和 HMG-CoA 合酶。在线粒体中，这两个酶催化生成的 HMG-CoA 用于酮体合成，这两个酶在胞质中的同功酶催化生成的 HMG-CoA 则用于合成胆固醇。四步反应将 HMG-CoA 转化为类异戊二烯中间体**异戊烯基焦磷酸**(isopentenyl pyrophosphate)(图 19-33)。

1) HMG-CoA 的 CoA 硫酯基由 **HMG-CoA 还原酶**催化，经依赖 NADPH 的 4 电子还原反应还原成醇，生成**甲羟戊酸**(mevalonate)，一个 C_6 化合物。　601
2) 新生成的 OH 基被**甲羟戊酸 5 磷酸转移酶**磷酸化。
3) 磷酸基团再被**磷酸甲羟戊酸激酶**焦磷酸化。
4) **焦磷酸甲羟戊酸脱羧酶**催化分子发生 ATP 依赖性脱羧-脱氢反应。



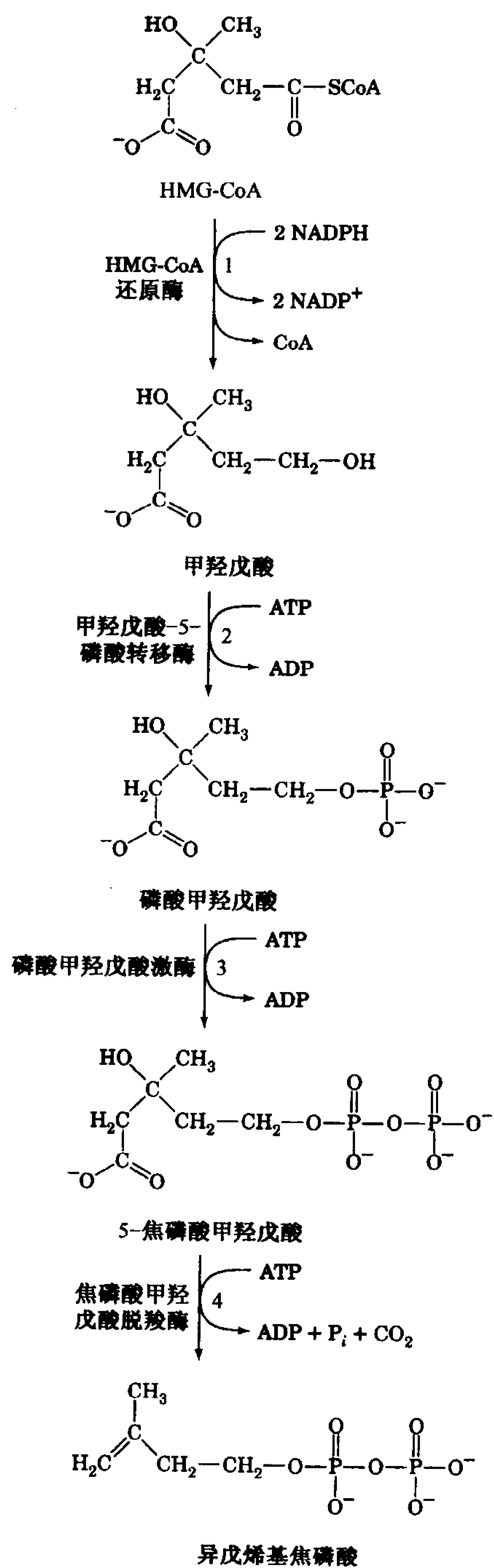
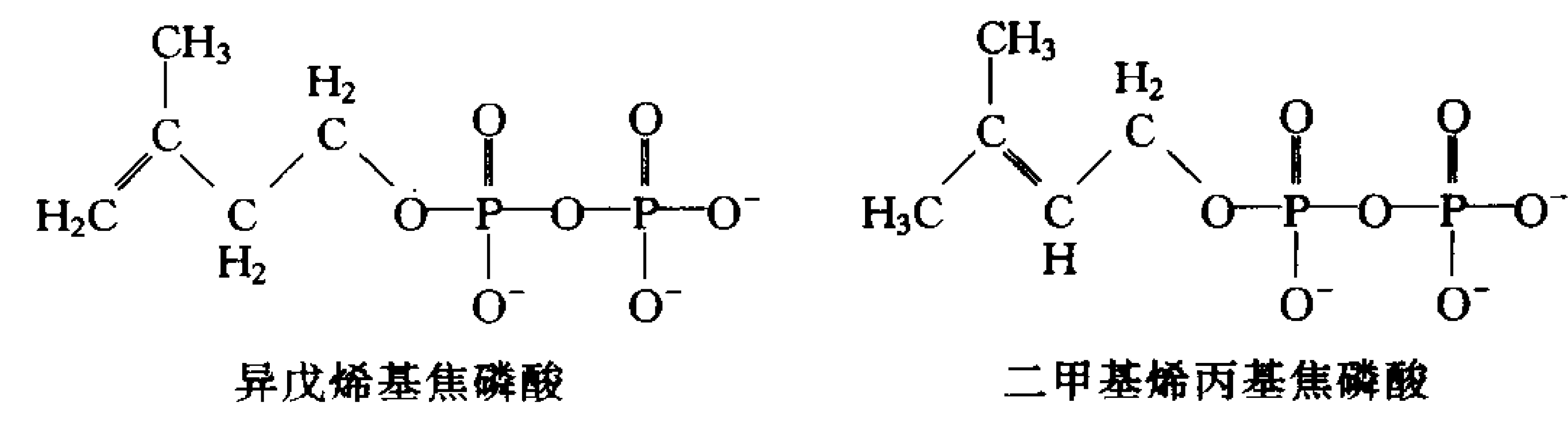


图 19-33 从 HMG-CoA 合成异戊烯基焦磷酸的途径

6 个异戊二烯聚合生成鲨烯

异戊烯基焦磷酸被转化为**二甲基烯丙基焦磷酸**(dimethylallyl pyro-phosphate)，反应由异戊烯基焦磷酸异构酶催化。



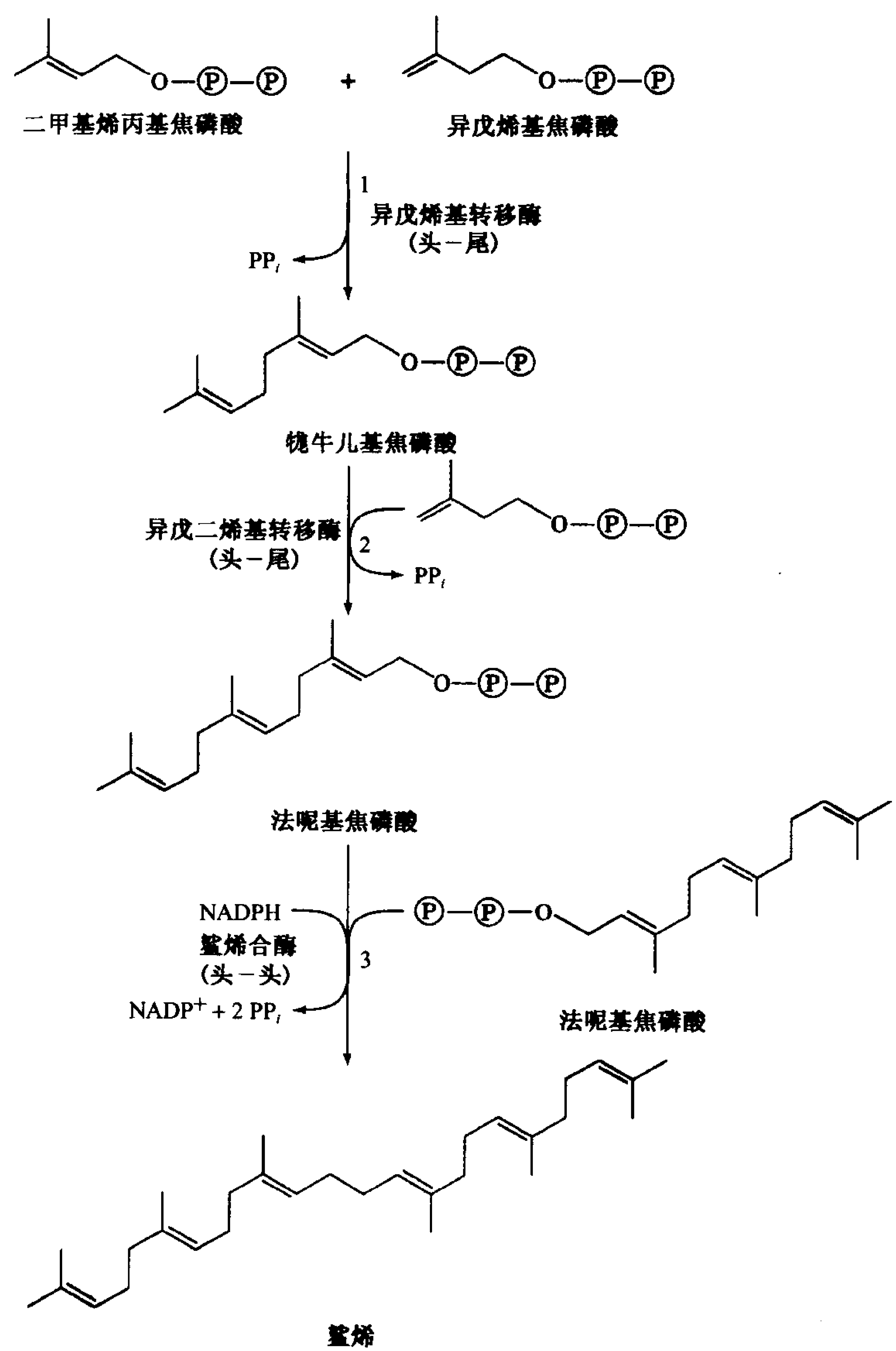


图 19-34　从异戊烯基焦磷酸和二甲基烯丙基焦磷酸合成鲨烯的途径

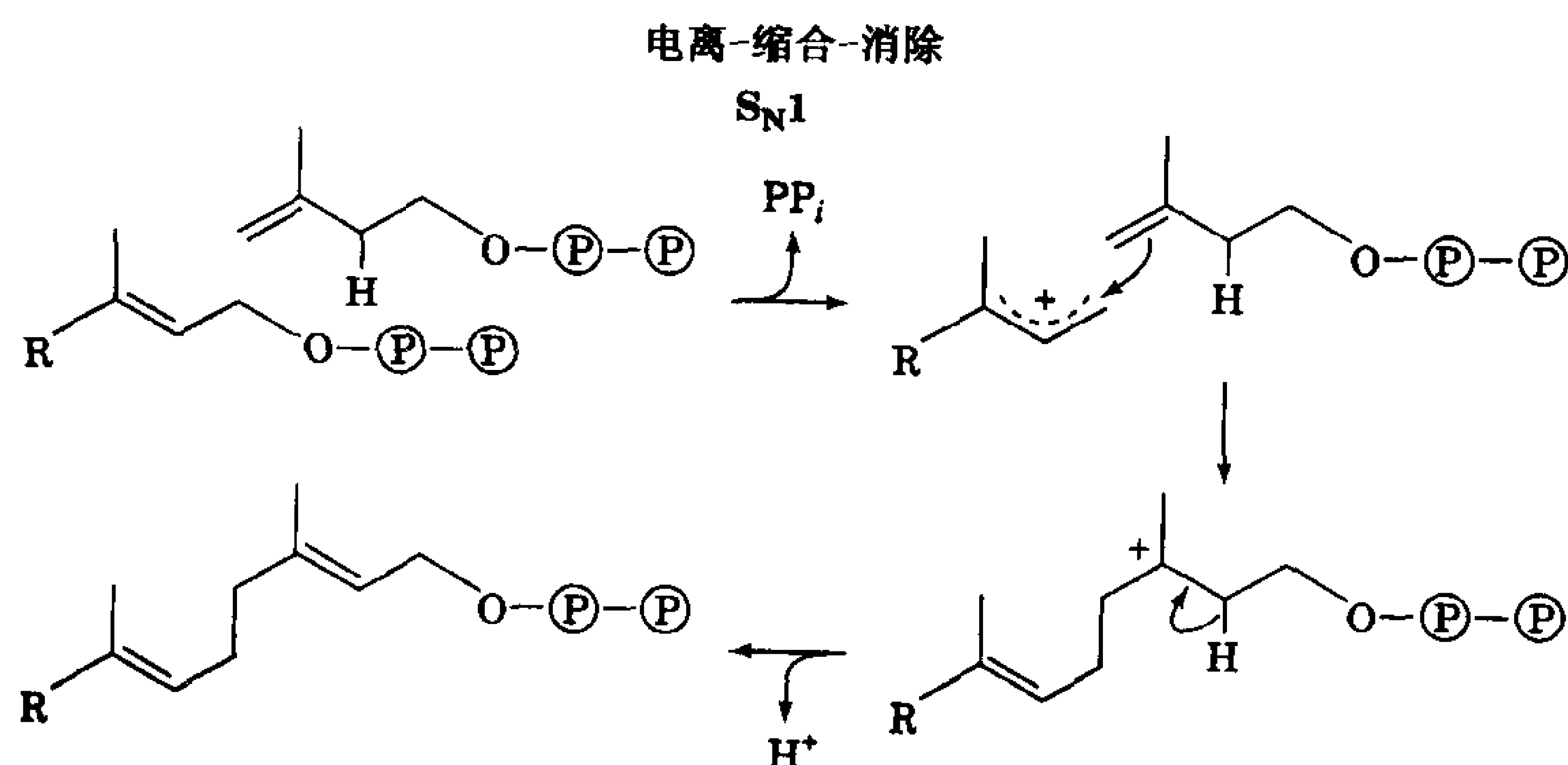
该途径涉及两个由异戊烯基转移酶催化的头-尾缩合反应和一个由鲨烯合酶催化的头-头缩合反应。

4 个异戊烯基焦磷酸和 2 个二甲基烯丙基焦磷酸缩合形成 C_{30}胆固醇的前体**鲨烯**(squalene),三步反应由两个酶催化(图 19-34):

603

1) **异戊烯转移酶**催化二甲基烯丙基焦磷酸与异戊烯基焦磷酸首尾缩合形成 C_{10}化合物,(牻)牛儿基焦磷酸(geranyl pyrophosphate)。

2) 异戊烯转移酶催化(牻)牛儿基焦磷酸与异戊烯基焦磷酸第二次首尾缩合,产生 C_{15}化合物**法呢基焦磷酸**(farnesyl pyrophosphate)。实验证明只有少数几种酶可以通过具有电离-缩合-消除机理的 S_N1 反应形成正碳离子中间体,而异戊烯转移酶是其中之一。

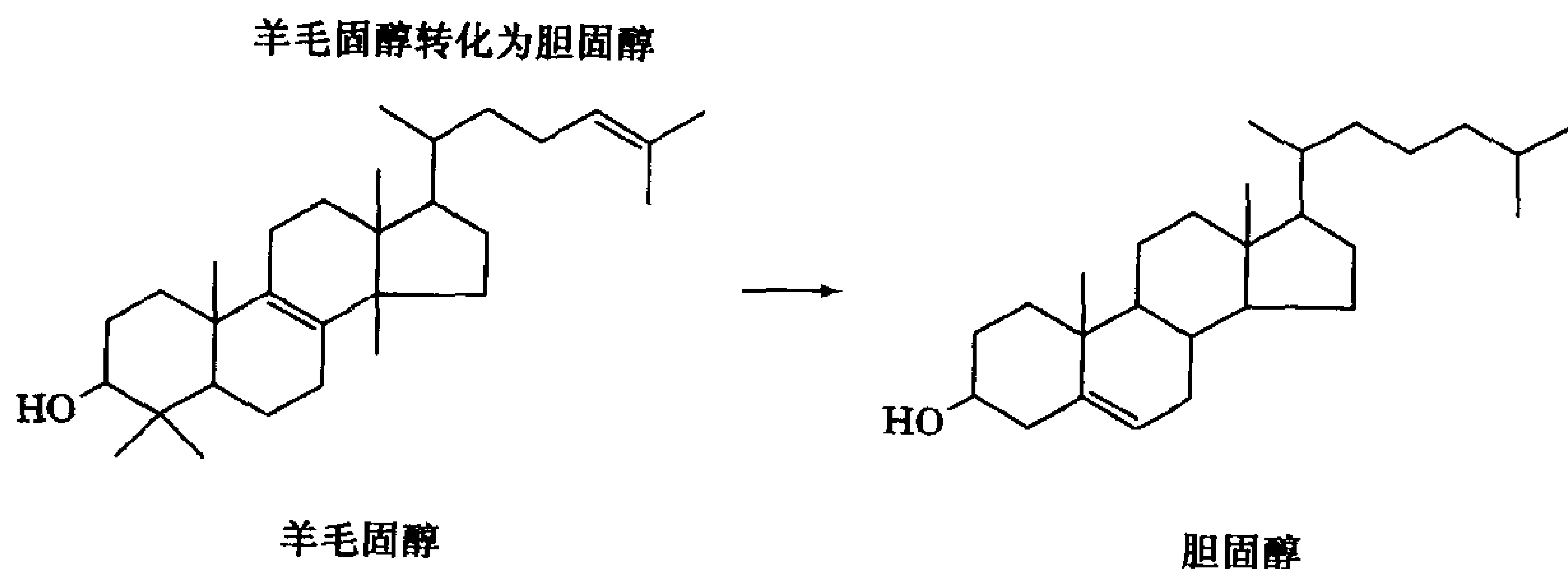


3) **鲨烯合酶**催化两个法呢焦磷酸分子头头缩合形成鲨烯。

法呢焦磷酸也是哺乳动物其他类异戊二烯化合物的前体,包括辅酶 Q(图 17-10)和某些脂连接膜蛋白的类异戊二烯尾部(节 10-1B)。

鲨烯环化最终生成胆固醇

鲨烯,一种线性烷烃,经过两步反应环化形成四环的固醇骨架。**鲨烯环氧化酶**催化鲨烯氧化生成 **2,3-环氧化鲨烯**(2,3-oxidosqualene)(图 19-35)。**鲨烯氧化环化酶**将此环氧化物转化为**羊毛固醇**(lanosterol)。反应是一个复杂的化学过程,包括 2,3-环氧化鲨烯环化成**原固醇**(protosterol)阳离子,再经过一系列 1,2 氢和甲基转移反应,重排生成羊毛固醇(图 19-36)。



604

羊毛固醇转化为胆固醇共需 19 步反应,包括氧化和 3 个甲基的去除。反应所需的酶都位于内质网膜上。

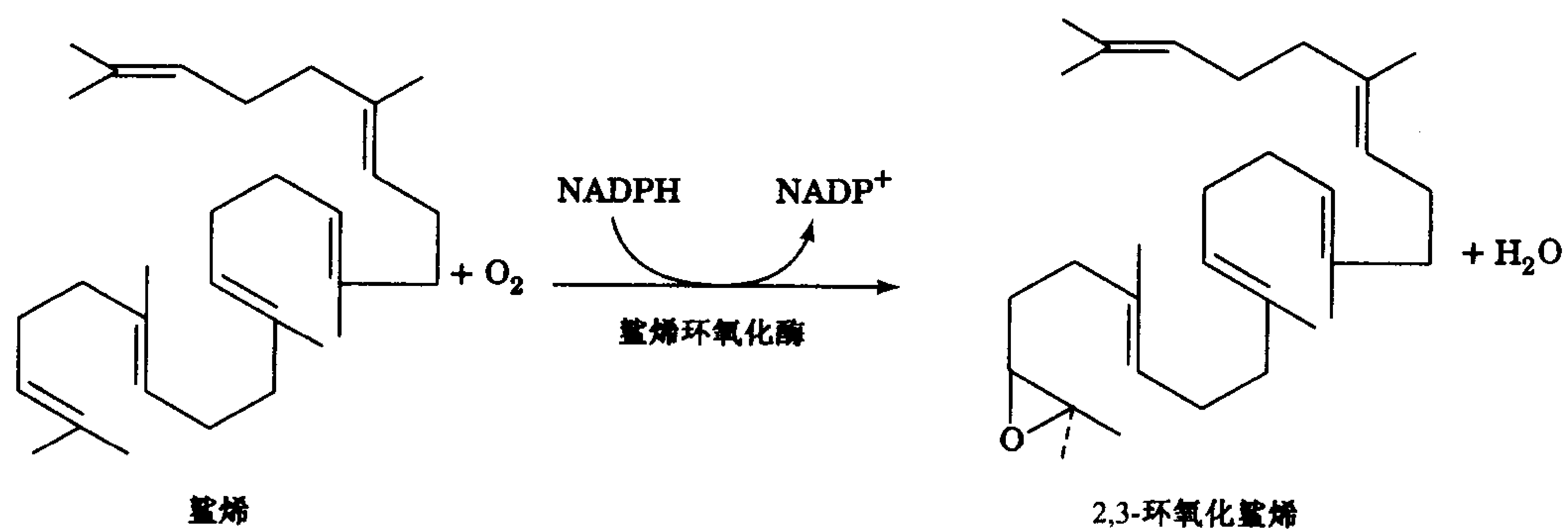


图 19-35 鲨烯单加氧酶反应

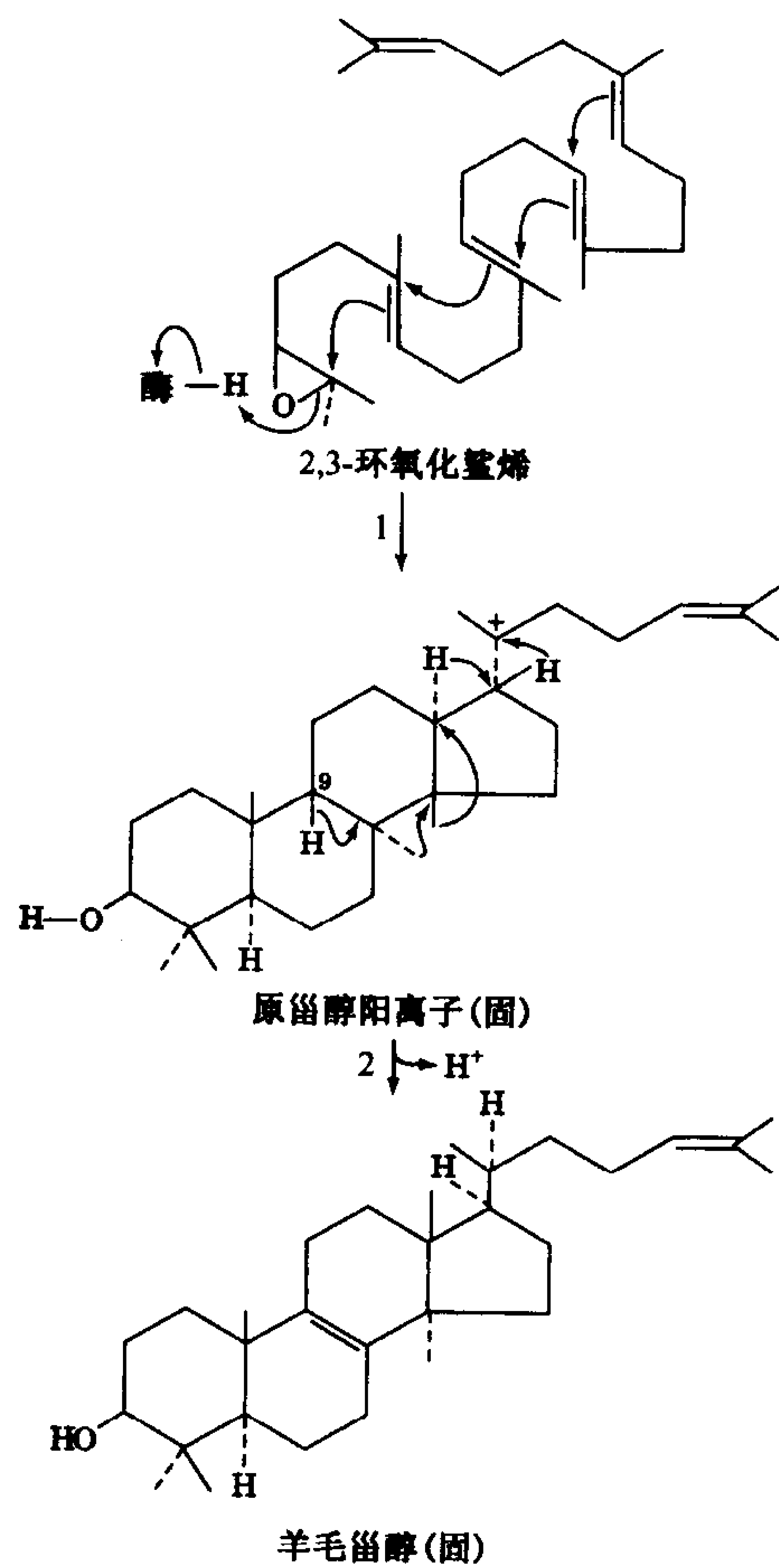


图 19-36 鲨烯环氧化酶反应

(1)2,3-环氧化鲨烯环化生成原固醇阳离子,这一过程由酶介导鲨烯环氧化物的质子化开始。环氧环打开留下来一个电子缺失的中心,它的移动驱动了一系列的环化反应的发生,从而形成原固醇阳离子。(2)固醇C9上去掉一个质子以形成双键,从而启动了一连串的甲基和氢化物的转移,最终生成了中性的羊毛固醇。

B. 胆固醇的转运

由肝脏合成的胆固醇或被转化为胆汁酸(图 19-1),或被**乙酰 CoA :胆固醇酰基转移酶**(ACAT)酯化形成胆固醇脂。

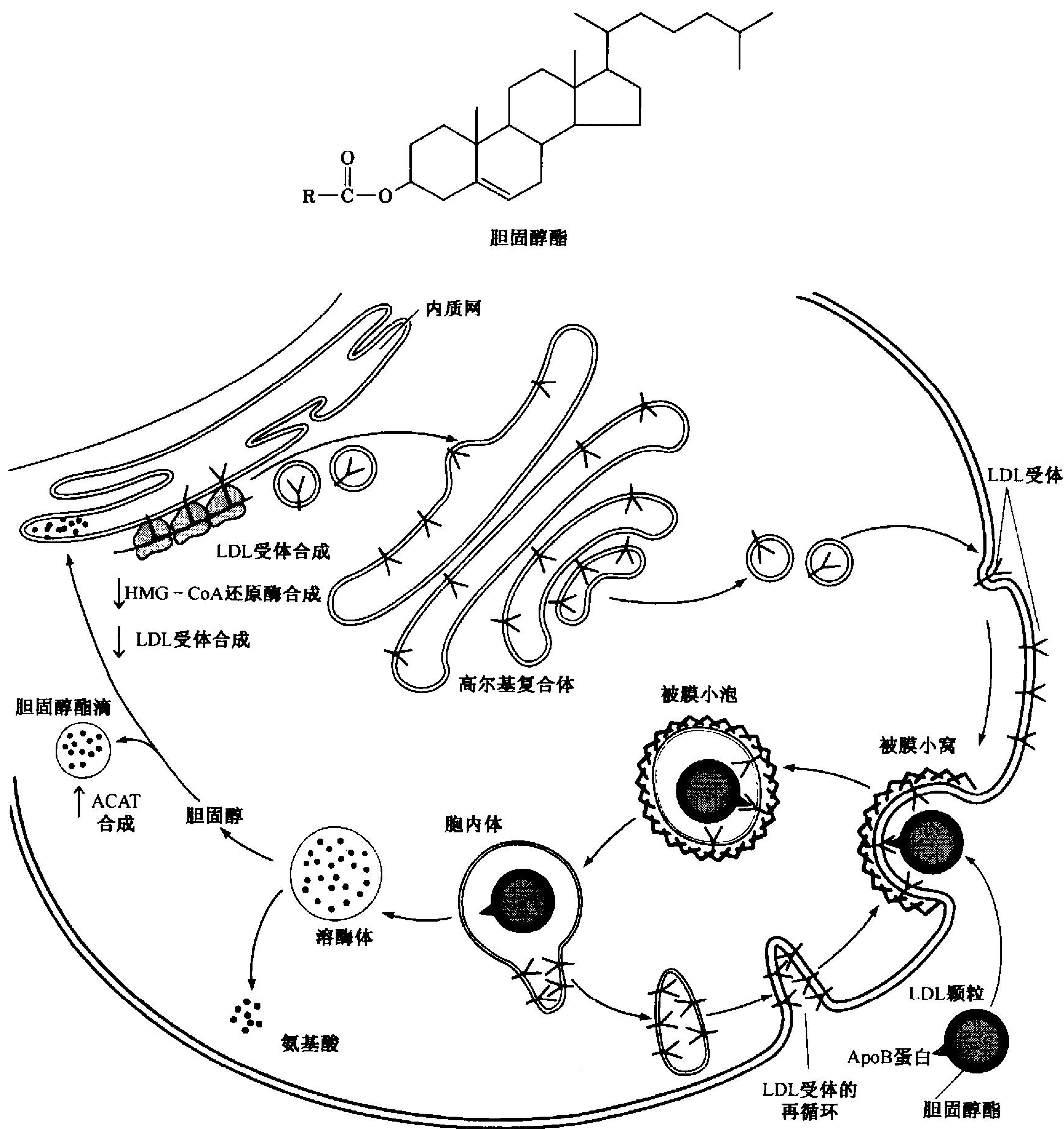


图 19-37　哺乳动物细胞 LDL 受体介导的胞吞作用

LDL 受体在内质网上合成,经过高尔基体加工,并插入到细胞质膜上,作为有被小窝的组成部分。LDL 上的载脂蛋白 B(apo B)特异地与有被小窝上的受体结合,使得 LDL 被转运到细胞内。胞内体运送 LDL 到溶酶体中,而 LDL 受体重新回到细胞质膜上(节 10-3)。溶酶体降解 LDL,释放出胆固醇,胆固醇的出现降低了 HMG-CoA 还原酶和 LDL 受体合成的速率(向下箭头表示),同时增加了脂酰基CoA:胆固醇酰基转移酶的合成速率(向上箭头表示)。[引自 Brown, M. S. and Goldstein, J. L., Curr. *Top*: *Cell*. *Reg*. 26, 7(1985)]

这些强疏水化合物,以脂蛋白复合物形式在体内转运(节 19-1B)。它们首先包裹于 VLDL 内进入血液。随着 VLDL 循环,它们的三酰甘油组分和许多载脂蛋白被除去,逐渐变成 IDL 和 LDL。外周组织通常通过受体介导的胞吞作用从 LDL 中获得外来的胆固醇(图 19-37;节 10-3B)。在细胞内,胆固醇酯被溶酶体的脂酶水解成游离胆固醇,或插入细胞膜,或被 ACAT 重新酯化成胆固醇酯而贮存起来。

小肠吸收食物中的胆固醇,以乳糜微粒形式运输。这样,肝脏和外周组织既可以合成胆固醇也能从循环的脂蛋白中获取。胆固醇在肝脏和外周组织间不断循环:LDL 从肝脏中运出胆固醇,而 HDL 又将它们运回肝脏。过量的胆固醇被肝脏转化成胆汁酸,这是目前知道的机体处置这种水不溶物质的惟一有效机制。

C. 胆固醇代谢的调控

胆固醇生物合成和转运是由① HMG-CoA 还原酶的活性、② LDL 受体合成的速率、③胆固醇被 ACAT 酯化的速率所调节。

HMG-CoA 还原酶是胆固醇生物合成的主要调控位点

605

HMG-CoA *还原酶是胆固醇生物合成的限速酶,即是代谢途径的主要调节位点*。HMG-CoA 还原酶是一个含 887 个残基的内质网膜连接酶,通过可逆磷酸化作用进行短周期调节。然而,*最基本的调节机制还是细胞内酶量的长周期反馈调节*。当 LDL-胆固醇或甲羟戊酸含量下降,HMG-CoA 还原酶的含量可通过增加酶的合成和减少酶的降解而提高至原来含量的 200 倍,这些反应是可逆的。

606

HMG-CoA 还原酶也以高活性和低活性两种形式存在,并可相互转化,这和糖原磷酸化酶,糖原合酶(节 15-3B)和其他一些酶相同。未修饰的 HMG-CoA 还原酶有较高活性而它的磷酸化形式活性较低。HMG-CoA 还原酶磷酸化(去活)位点在 Ser 871 处,催化此反应的酶与催化乙酰 CoA 羧化酶进行共价修饰的 AMP 依赖性蛋白激酶相同(节 19-4B)。看来这种调控机制是为了在 ATP 水平降低而 AMP 水平升高时,通过抑制生物合成途径来保存能量。

LDL 受体活性负责从血液里移去胆固醇

血液中的任何物质的浓度都是源于其生成速率和运出速率的平衡。LDL 来自于 VLDL,VLDL 由肝脏分泌,并运送胆固醇酯和三酰甘油到身体的其他部位。限制胆固醇酯和三酰甘油合成和进食低脂肪、低固醇饮食可以降低 VLDL 和 LDL 的生成速率。从血液中去除 LDL 的过程受 LDL 受体调节,因此该受体对维持胞质中 LDL-胆固醇水平起着重要作用。当 VLDL 生成速率一定时,*血清中 LDL 的浓度取决于肝脏从血液中去除 IDL 和 LDL 的速率,而后者反过来又取决于肝细胞表面的功能性 LDL 受体的数量*(IDL 和 LDL 都含有与 LDL 受体特异结合的载脂蛋白,图 19-38a)。

高血胆固醇[**高胆固醇血症**(hypercholesterolemia)]是由于 LDL 的过量生成和/或利用率降低两方面代谢障碍引起:① **家族性高胆固醇血遗传疾病**(FH;框 10-1)和② 高胆固醇食物的消耗。FH 杂合子缺少功能性 LDL 受体,胞质中 LDL-胆固醇含量比正常值高 3~5 倍(图 19-38b)。更为常见的 FH 杂合子大约只含有正常数量一半的功能性 LDL 受体,胞质中 LDL-胆固醇的水平约为正常值的两倍。

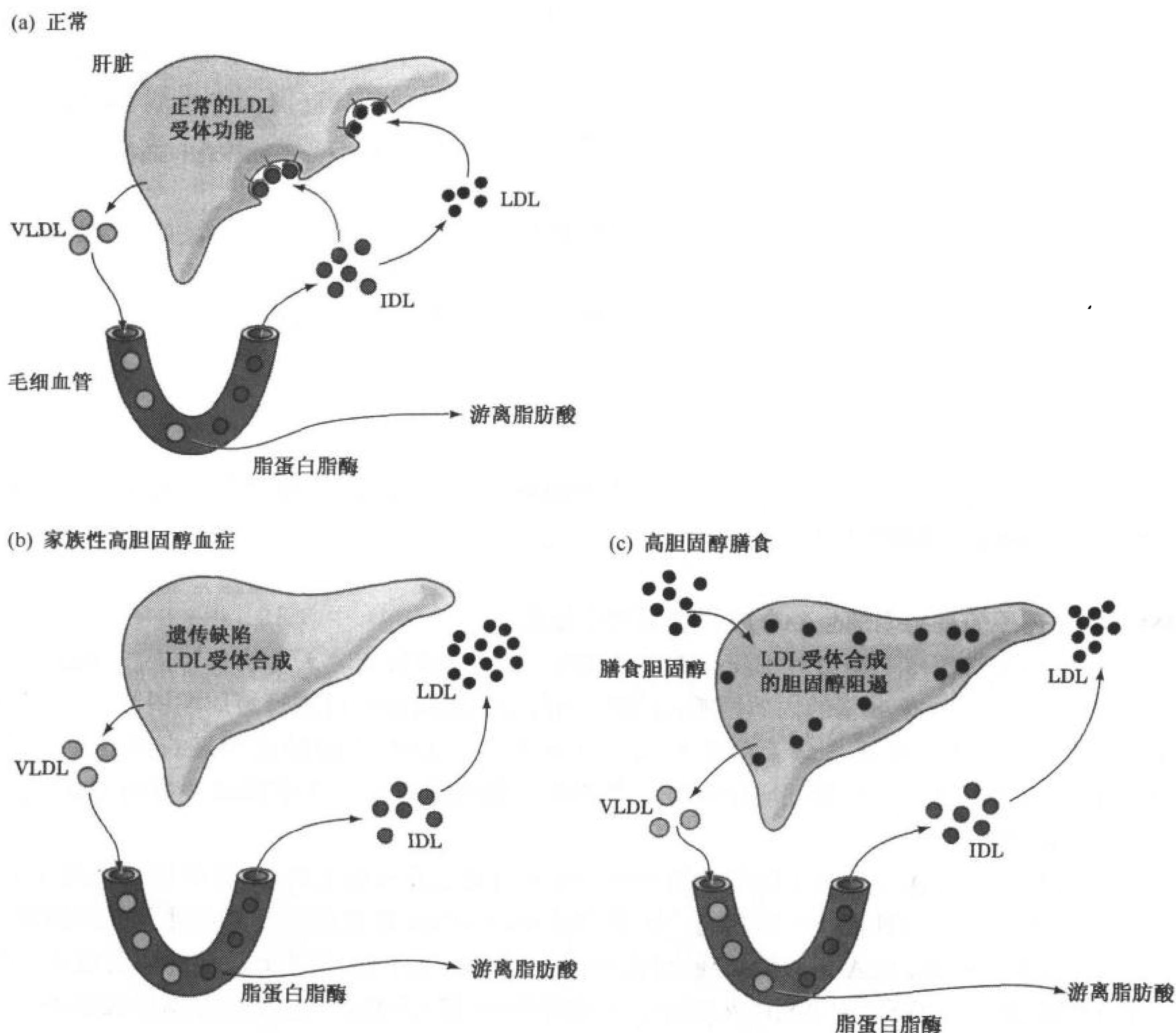


图 19-38 肝脏 LDL 受体对血浆 LDL 的吸收和 LDL 生成的调控

(a)在正常人体中,肝脏分泌 VLDL,然后在其外周组织的毛细血管中转化为 IDL。近一半的血浆 IDL 颗粒结合到 LDL 受体,而被肝脏摄取。剩下的在外周组织中被转化为 LDL。(b)在一些基因缺陷病的个体中,如人们熟知的家族性高胆固醇血症(FH)患者,肝脏 LDL 受体减少或者缺失。(c)在正常个体中,如果食用了高胆固醇的食物,肝脏里就会富集胆固醇而抑制LDL受体的产生速率。无论是基因型的还是饮食所致的LDL受体缺乏都会加速LDL的生成和降低LDL的吸收速率,而引起血浆 LDL 水平的升高。[引自 Goldstein, J.L. and Brown, M.S., *J. lipid Res*. 25, 1457(1984)]

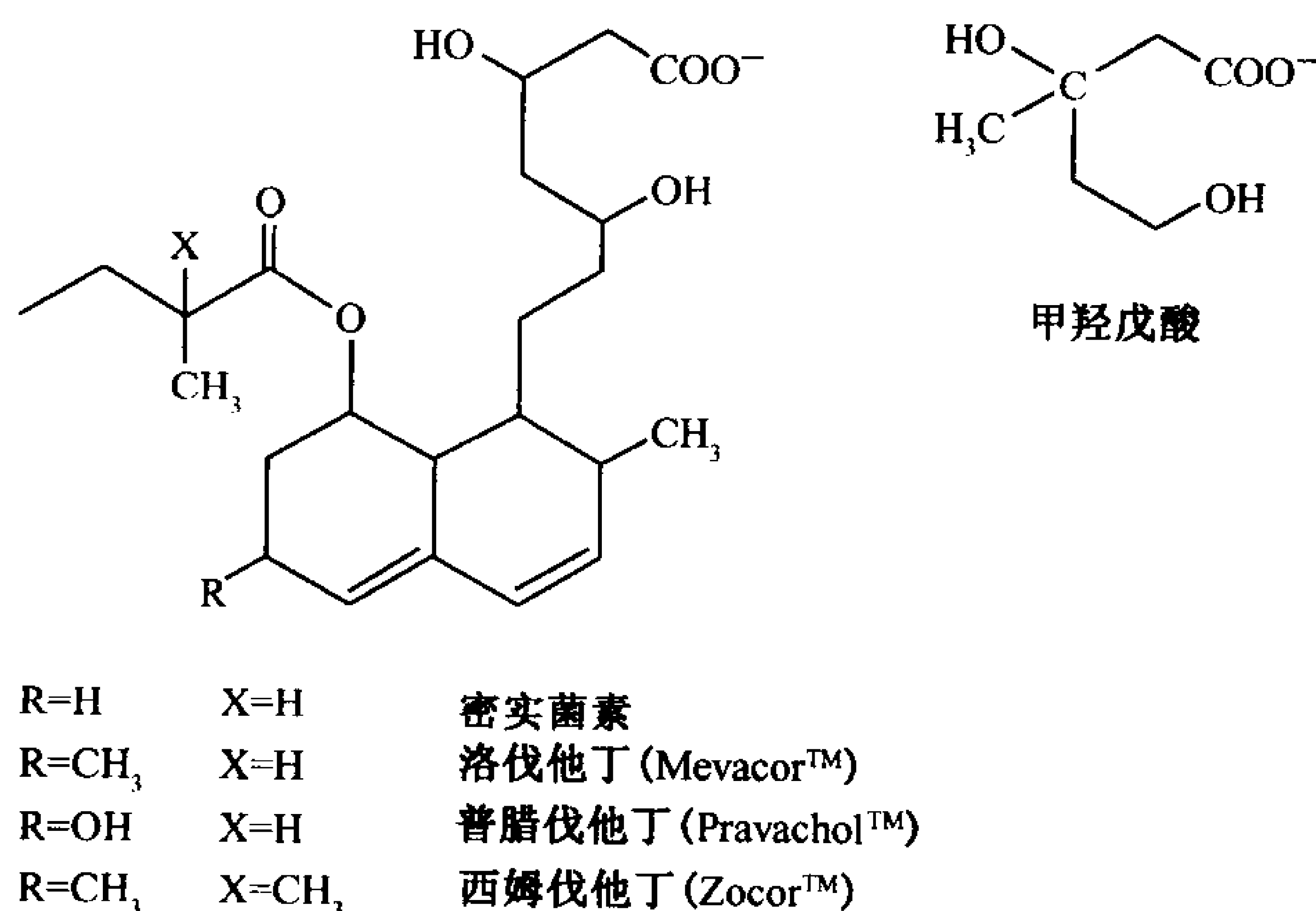
摄入过量的高胆固醇饮食产生相似但较温和的效应(图 19-38c)。超量的食物胆固醇以乳糜微粒残体形式进入肝脏细胞。高浓度的胞内胆固醇会抑制 LDL 受体蛋白的合成,从而导致肝细胞表面 LDL 受体的缺乏,进而使血液 LDL 浓度升高。

除了进食低胆固醇食物外,还有两种办法可以用来防治高胆固醇血症。

1) 服用能结合胆汁酸的树脂,阻止它们被小肠吸收。由胆固醇转化而来的胆汁酸,通常能有效地被肝脏重吸收和再循环,每天可在小肠和肝脏之间循环多次。树脂结合的胆汁酸被排泄迫使肝脏将更多的胆固醇转化成胆汁酸。血清胆固醇含量降低,继而诱导 LDL 受体的合成(当然 FH 杂合子不行)。遗憾的是,血清胆固醇水平的降低也诱导 HMG-

CoA 还原酶的合成，这个酶能提高胆固醇合成速率。所以服用能结合胆汁酸的树脂只能使血清胆固醇水平降低 15%～20%。

2）用 HMG-CoA 还原酶的竞争性抑制剂进行治疗，通常使用真菌产物**密实菌素**(compactin) 607 和**洛伐他丁**(lovastatin)，它们是甲羟戊酸的类似物。这些抑制剂能够降低胆固醇生物合 608 成的速率。细胞胆固醇供应的减少，也会诱导 LDL 受体和 HMG-CoA 还原酶的合成。用洛伐他丁治疗 FH 杂合子通常可使血清胆固醇降低 30%。



用洛伐他丁治疗，配合服用能结合胆固醇的树脂，可显著降低血清中胆固醇 50%～60%。其他近期开发的 HMG-CoA 还原酶抑制剂如 pravastatin 和 simvastatin，即人们称之为**抑制素**(statin)的药物，有更显著的疗效。

小　结

1. 三酰甘油的消化依赖于胆汁酸乳化活力和脂质-水界面的脂酶的活化。在它们被吸收后，脂质消化产物被包裹在脂蛋白中，以便经过血流输运到组织。
2. 借助激素敏感性三酰甘油脂酶，三酰甘油在其储存于脂肪组织的地方被消化释放出脂肪酸。
3. 脂肪酸氧化是从脂酰基与 CoA 形成硫醚而被激活开始的。
4. β 氧化发生 4 个反应：①α，β 双键的形成；②双键的水合；③脱氢形成 β-酮脂酰 CoA；④ 借 CoA 硫解产生乙酰 CoA 和缩短了 2 个碳原子的脂酰 CoA。这个过程反复进行直到具偶数碳原子的脂肪酸被转化为乙酰 CoA，而具奇数碳原子的脂肪酸被转化为乙酰 CoA 和 1 分子丙酰 CoA。通过柠檬酸循环和氧化磷酸化乙酰 CoA 被氧化产生 ATP。
5. 不饱和脂肪酸的氧化需要异构酶转换 Δ^3 双键为 Δ^2 双键，并且需要还原酶移去 Δ^4 双键。奇数链脂肪酸的氧化产生丙酰 CoA，后者经过 $Co(B_{12})$依赖性途径转化成琥珀酰 CoA，极长链脂肪酸经过过氧化酶体中的三酶系统部分被氧化。
6. 肝脏利用乙酰 CoA 合成乙酰乙酸和 β-羟丁酸，它们被释放到血流。利用这些酮体作为燃料的组织将它们转化回乙酰 CoA。
7. 在脂肪酸合成中，线粒体的乙酰 CoA 经三羧酸循环转运系统被转运到胞浆，再经乙酰 CoA 羧化酶的激活活化为丙二酸单酰 CoA。
8. 哺乳动物中，以多功能同二聚体酶的形式存在着 7 酶系列酶活化体系，通过这个酶活性体系每次将脂酰 ACP

链延长 2 个碳原子。酶结合脂酰基和丙二酸单酰 CoA 缩合形成 β-酮脂酰中间体和 CO_2，在连续反应中两个还原反应和一个脱水反应产生一个脂酰 ACP。这一系列反应似乎像 β 氧化的逆反应，不过这些反应是由胞浆中游离酶所催化。棕榈酸(C_{16})是脂肪酸生物合成的正常产物，是经 7 次这样的反应循环合成的，然后借硫脂酶切离 ACP。

9. 其他脂肪酸是由棕榈酸经过延长酶和去饱和酶的作用合成的。由脂酰 CoA，甘油醛-3-磷酸或二羟丙酮磷酸合成的人三酰甘油偏向于在 C1 处连接饱和脂肪酸而在 C2 处连接不饱和脂肪酸。
10. 激素调控脂肪酸降解和合成这两个相反的途径。胰高血糖素和肾上腺素激活脂肪组织中的激素敏感性脂酶，由此增加其他组织用于氧化的脂肪酸的供给并使脂酰 CoA 羧化酶失活。胰岛素则有相反的效应。激素通过调控合成同样调节乙酰 CoA 羧化酶和脂肪酸合酶的水平。
11. 哺乳动物中，磷脂酰乙醇胺和磷脂酰胆碱是由 1，2-二酰甘油和头部基团的 CDP 衍生物合成的。磷脂酰肌醇，磷脂酰甘油和心磷脂的合成是从 CDP-二酰甘油开始的。
12. 通过添加上来自核苷酸糖基的糖基单位，由神经酰胺(*N*-酰基鞘氨醇，一种棕榈酸和丝氨酸的衍生物)合成鞘氨醇糖脂。
13. 胆固醇从乙酰单位合成，在合成途径中，乙酰单位经由 HMG-CoA 和甲羟戊酸中间体先转化为 C_5 异戊二烯单位。6 个异戊二烯缩合形成 C_{30}化合物鲨烯，后者环化生成羊毛固醇，它是胆固醇的固醇前体。
14. HMG-CoA 还原酶是胆固醇合成的限速酶，对它的调控既通过长周期控制其合成速率又通过短周期磷酸化进行，细胞胆固醇的水平同样依赖于它向胆固醇酯和其他化合物的转化，也依赖于载胆固醇 LDL 的胞吞，这种胞吞作用随细胞表面 LDL 受体的数量而改变。

参考文献

Derewenda, Z.S., Structure and function of lipases, *Adv. Prot. Chem.* **45,** 1–52 (1994).

Dowhan, W., Molecular basis for membrane phospholipid diversity: Why are there so many lipids? *Annu. Rev. Biochem.* **66,** 199–232 (1997).

Eaton, S., Bartlett, K., and Pourfarzam, M., Mammalian mitochondrial β-oxidation, *Biochem. J.* **320,** 345–357 (1996).

Goldstein, J.L. and Brown, M.S., Regulation of the mevalonate pathway, *Nature* **343,** 425–430 (1990).

Kent, C., Eukaryotic phospholipid biosynthesis, *Annu. Rev. Biochem.* **64,** 315–343 (1995).

Ludwig, M.L. and Matthews, R.G., Structure-based perspectives on B_{12}-dependent enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* **66,** 266–313 (1997).

Mannaerts, G.P. and Van Veldhoven, P.P., Metabolic pathways in mammalian peroxisomes, *Biochimie* **75,** 147–158 (1993). [A brief review of peroxidase-specific metabolic pathways, including β oxidation.]

Platt, F.M., Neises, G.R., Reinkensmeier, G., Townsend, M.J., Perry, V.H., Proia, R.L., Winchester, B., Dwek, R.A., and Butters, T.D., Prevention of lysosomal storage in Tay–Sachs mice treated with *N*-butyldeoxynojirimycin, *Science* **276,** 426–431 (1997).

Thompson, G.A., *The Regulation of Membrane Lipid Metabolism* (2nd ed.), CRC Press (1992).

Töpfer, R., Martini, N., and Schell, J., Modification of plant lipid synthesis, *Science* **268,** 681–684 (1995).

Vance, D.E. and Vance, J. (Eds.), *Biochemistry of Lipids, Lipoproteins and Membranes,* Elsevier (1996).

van Echten, G. and Sandhoff, K., Ganglioside metabolism: enzymology, topology, and regulation, *J. Biol. Chem.* **268,** 5341–5344 (1993).

关 键 词

界面激活 interfacial activation

高密度脂蛋白 HDL

酮症 ketosis

激素敏感性脂酶 hormone-sensitive lipase

乳糜微粒 chylomicron

β 氧化 β oxidation

酰基载体蛋白 acyl-carrier protein

短周期调控 short-term regulation

极低密度脂蛋白 VLDL

均裂切割 homolytic cleavage

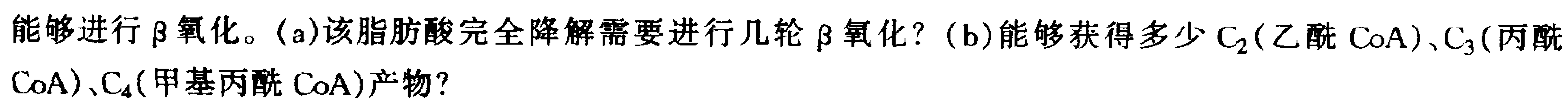
延长酶 elongase
长周期调控 long-term regulation
中密度脂蛋白 IDL
异裂切割 heterolytic cleavage
去饱和酶 desaturase
异戊二烯单位 isoprene unit
低密度脂蛋白 LDL
生酮作用 ketogenesis
必需脂肪酸 essential fatty acid

学习思考题

1. 胆汁酸盐是怎样辅助脂的消化和吸收?
2. 概述脂蛋白在人体中的作用。
3. 概述在脂肪酸活化和降解为乙酰 CoA 过程中的化学转化。
4. 氧化不饱和的和奇数链的脂肪酸需要哪些另外的步骤?
5. 酮体是怎样被合成和降解的?
6. 叙述将脂肪酸运输入线粒体和乙酰 CoA 进入胞浆的穿梭系统。
7. 概述脂肪酸氧化和合成的异同。
8. 叙述人体调控脂肪酸代谢的主要机制。
9. 三酰甘油、甘油磷脂和鞘脂是怎样合成的?
10. 概述胆固醇合成的化学事件。
11. 为什么血清胆固醇水平依赖于 LDL 受体的活性?

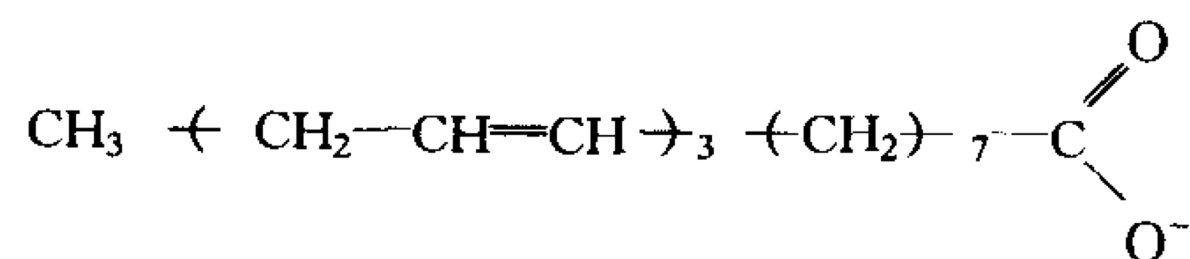
练 习 题

1. 解释为什么肉碱棕榈酰基转移酶 II 遗传缺陷的个体会发生肌无力。为什么节食期间这些症状会加重?
2. β 氧化的前三步反应(图 19-9)与柠檬酸循环连续的三步反应化学性质相似,这是哪三步反应?
3. 某种支链脂肪酸,如降植烷酸,



降植烷酸

能够进行 β 氧化。(a)该脂肪酸完全降解需要进行几轮 β 氧化? (b)能够获得多少 C_2(乙酰 CoA)、C_3(丙酰 CoA)、C_4(甲基丙酰 CoA)产物?
4. 对一个需要限定摄取热量的个体来说,为什么应首选不饱和脂肪,而不是饱和脂肪?
5. 为什么肝细胞缺乏 3-酮酰基 CoA 转移酶是很重要的问题(图 19-18)?
6. 三羧酸转运系统提供胞浆合成棕榈酸的乙酰 CoA。这一途径提供的合成棕榈酸所需要的 NADPH 的百分比是多少?
7. 用 $^{14}CO_2$ 和乙酰 CoA 合成丙二酸单酰 CoA, ^{14}C 会出现在棕榈酸的在哪一个碳原子上?
8. 下面的脂肪酸能否在动物中合成? 为什么?



9. 以 ATP 为单位，比较从线粒体乙酰 CoA 合成硬脂酸所需的能量以及将硬脂酸降解成(a)乙酰 CoA(b)CO_2 重新获得的能量。

10. 一个动物食用^{14}C 标记羧基的棕榈酸。(a)在生成酮体的状况下，标记物将出现在乙酰乙酸的什么部位？(b)在合成膜脂时，标记物将出现在二氢鞘氨醇的什么部位？

(中央民族大学　史景熙　译　清华大学　蔡国平　校)

第20章　氨基酸代谢



所有的有机体都需要氮源。复杂的代谢途径将少数几种含氮化合物转变为许多其他化合物，包括用于蛋白质合成的氨基酸。这些豌豆类植物与固氮微生物共生，后者为它们制造了有用的氮源；其他农作物则需要含氮的肥料。(Hans Reinhard/OKAPIA/Photo Researchs, Inc.)

612

氨基酸代谢包括大量的合成和降解反应，通过这些反应可以合成氨基酸，作为多肽或其他化合物的前体，也可以降解产生能量用于代谢。氨基酸的化学转化不同于糖类或脂类化合物的化学转化，因为它涉及元素氮，因此我们必须研究生物体系中氮的来源及其去向。

细胞内的氨基酸大部分被掺入蛋白质，后者不断地被合成和降解。除了这种动态的多聚氨基酸库以外，氨基酸没有类似于糖原或三酰甘油这样的真正的贮存形式。哺乳动物可以合成某些氨基酸，并从它们的食物中获取其他的氨基酸。食物中获得的过量氨基酸并不是简单地排出体外，而是转化为共同的代谢物，作为葡萄糖、脂肪酸和酮体的前体，因此是代谢燃料。

在本章中，我们将讨论氨基酸代谢的途径，从蛋白质的降解及其组成氨基酸的**脱氨作用**(deamination)(去除氨基)开始，然后我们研究氮掺入尿素排出体外，接着介绍个别氨基酸的碳骨架降解与合成的途径，最后我们简要介绍涉及氨基酸的其他一些生物合成途径，以及**固氮作用**(nitrogen fixation)，即将大气中的 N_2 转变为可被生物利用的形式的过程。

1．细胞内蛋白质的降解

活细胞内的组分一直在更新。蛋白质的生命期从短至几分钟到几个星期或更长。在任何情况下，细胞都不停地从氨基酸合成蛋白质并又将蛋白质降解为氨基酸。这种看似浪费的过程有三个功能：①以蛋白质的形式贮存养分，并在代谢需要时将之降解，这个过程在肌肉组织中最为重要；②去除异常蛋白，它们的积累对细胞有害；③通过去除多余的酶和调节蛋白来调节细胞内的代谢。因此调控一种蛋白质的降解速度与调控其合成速度对细胞和有机体的经济性是同样重要的。

表 20-1　鼠肝中某些酶的半衰期

酶	半衰期/h
短半衰期酶	
鸟氨酸脱羧酶	0.2
RNA 聚合酶 I	1.3
酪氨酸氨基转移酶	2.0
丝氨酸脱水酶	4.0
PEP 羧化酶	5.0
长半衰期酶	
醛缩酶	118
GAPDH	130
细胞色素 *b*	130
LDH	130
细胞色素 *c*	150

引自 Dice, J. E. and Goldberg, A. L., Arch. Biochem. Biophys. 170, 214(1975)。

表 20-1 列出鼠肝中不同酶的半衰期，由此可见某一特定组织中不同酶的半衰期变化相当大。值得注意的是，降解最迅速的酶都位于重要的代谢调控位点，而那些相对稳定的酶在所有生理条件下催化活性几乎恒定。酶对降解的敏感性显然与其催化和变构性质一起演化，这样细胞

才能有效地应答环境变化和代谢需求。细胞中蛋白质降解的速度也随其营养状况和激素水平而异。例如，在营养缺乏条件下，细胞加速其蛋白质降解的速度，以便为那些必不可少的代谢过程提供必需的营养物质。

A. 溶酶体降解

溶酶体中包含有约 50 种水解酶类，包括多种蛋白水解酶。溶酶体维持其内部 pH 约为 5，其所含酶类均具有酸性最适 pH 值。这可能保护了细胞，避免偶然情况下溶酶体泄漏造成的破坏，因为溶酶体中的酶在细胞质的 pH 条件下大部分都将失活。

613

溶酶体可以降解细胞通过胞吞作用摄取的物质（见节 10-3B）。它们也可以回收细胞内的组分，这些胞内组分被包裹在液泡中，并与溶酶体融合。*在营养充足的细胞中，溶酶体的蛋白质降解是非选择性的。*但是在饥饿细胞中，这种降解会消耗必需的酶和调节蛋白，因此溶酶体也具有一种选择途径，即引入和降解含有五肽 Lys-Phe-Glu-Arg-Gln（KFERQ）或密切相关序列的胞内蛋白质，这种选择途径只有在长时间禁食后才会被活化。这种 **KFERQ** 蛋白质被选择性地从由于禁食而萎缩的组织（例如肝脏和肾脏）中去除，但不会从那些不萎缩的组织（例如脑和睾丸）中去除。许多正常和病理过程都伴有溶酶体活性的增加，例如，由于不被使用、神经切除或者外伤引起的肌肉损耗。在分娩后出现的子宫回缩，这个肌肉型器官的重量在 9 天内从 2 kg 减少到 50 g，就是这一过程的明显例子。许多慢性炎症，如**风湿性关节炎**（rheumatoid arthritis）就涉及溶酶体酶的细胞外释放，从而降解周围组织。

B. 泛素

真核细胞中的蛋白质降解，也可发生在一个需要 ATP 的过程中，这个过程不依赖溶酶体，而是需要**泛素**（ubiquitin）（图 20-1），一个 76 个残基组成的单体蛋白，因其广泛存在且含量丰富而

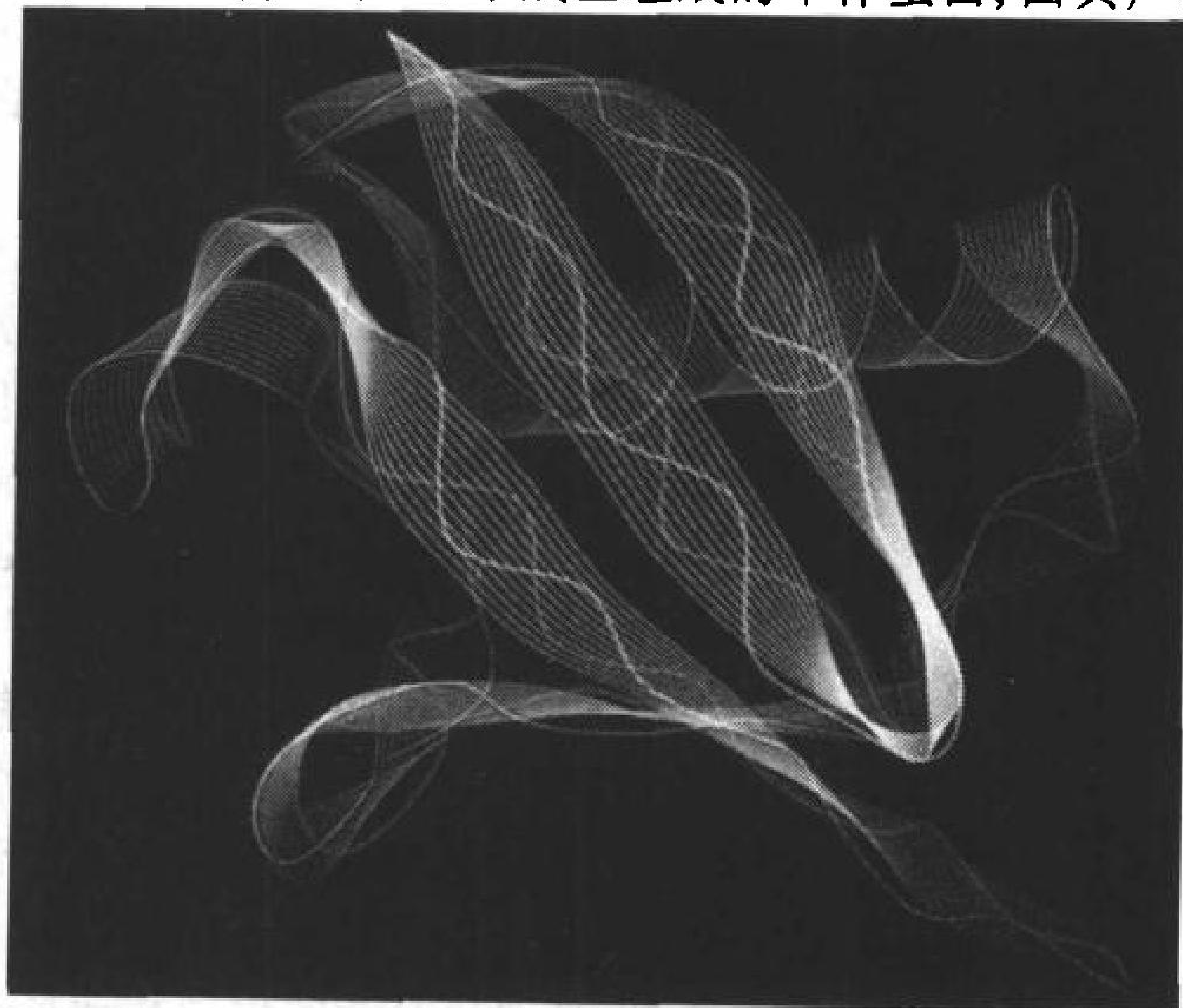


图 20-1　泛素的 X 射线结构

白色的条带代表多肽骨架，红色和蓝色曲线分别表明羧基和氨基的方向。（引自 Milk Carson，伯明翰阿拉巴马大学。伯明翰阿拉巴马大学的 Charles Bugg 测定）

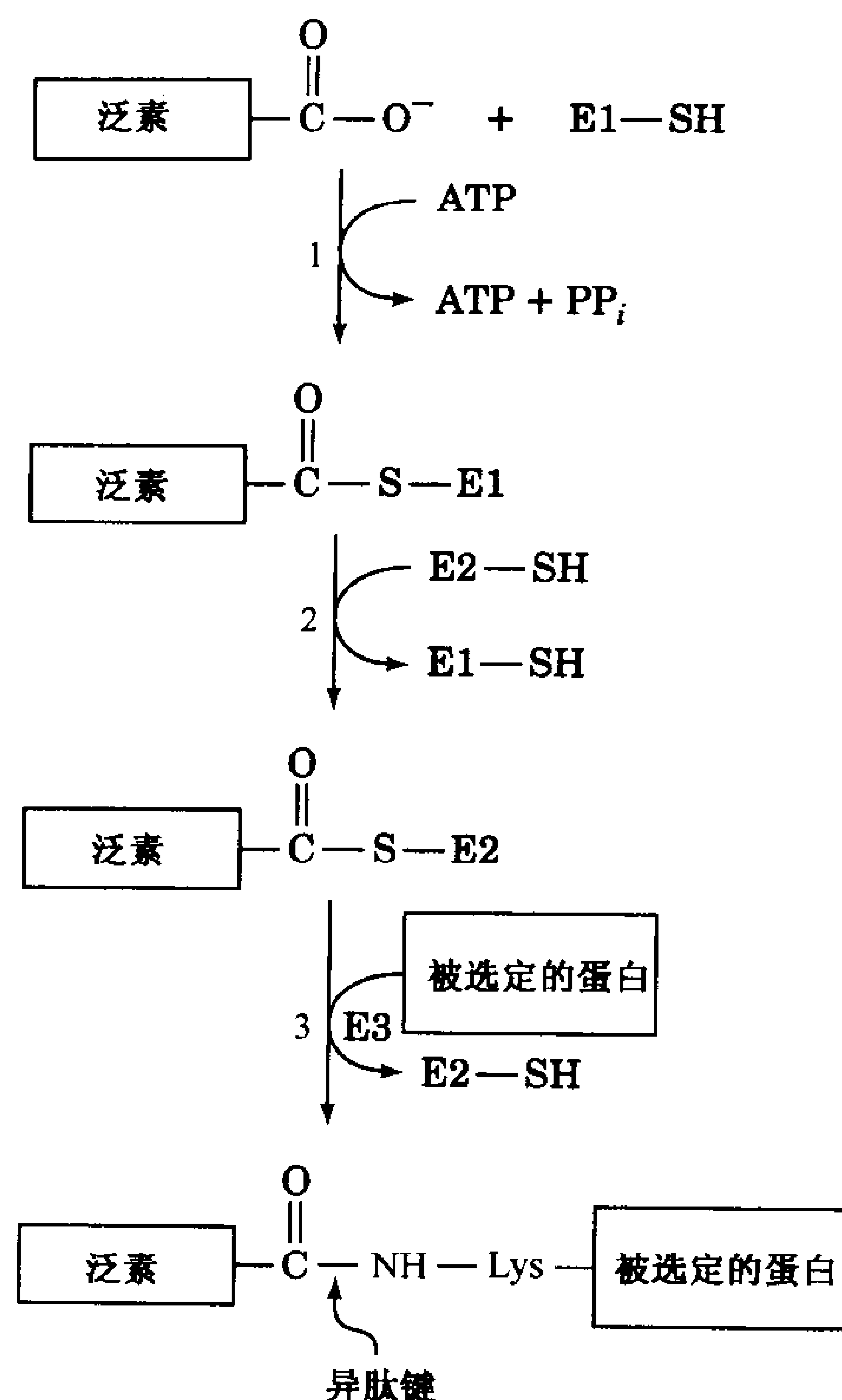


图 20-2 蛋白质泛素化涉及的反应

首先泛素的末端羧基在 ATP 水解驱动的一个反应中通过一个硫酯键与 E1 相连。随后已被活化的泛素转移到 E2 的巯基上，然后在 E3 催化的反应中转移到应被水解的蛋白质的 Lys ε-氨基上，从而使该蛋白质带上蛋白酶解的标记。

得名。它是已知的高度保守的真核蛋白质之一(在如此不同的生物机体如人、鲑鱼和果蝇中的泛素都相同)，这表明它独特地适合某些必需的细胞功能。

蛋白质通过与泛素共价相连而携带了降解标记。这个过程由 Avram Hershko 阐明，共分 3 步(图 20-2)：

1) 经过一个需要 ATP 的反应，泛素的羧基末端以硫酯键与**泛素活化酶**(ubiqutin-activating enzyme, E1)相连。

2) 泛素然后被转移到一个特定的巯基上，这个巯基位于被称为**泛素结合酶**(ubiqutin-conjugating enzyme, E2) 的许多同源蛋白质中的一个上。

3) **泛素-蛋白连接酶**(ubiqutin-protein ligase, E3)将活化的泛素从 E2 转移到一个先前已被结合的蛋白质的 Lys ε-氨基上，形成一个**异肽键**(isopeptide bond)。因此 E3 似乎在选择性降解蛋白质时起了关键作用。但是，细胞中存在大量不同的 E2(酵母中超过 10 个，植物拟南芥中超过 20 个)表明这些蛋白也在靶蛋白的选择中起作用。实际上，有些 E2 可以直接将泛素转移到靶蛋白上。

通常几个泛素分子被连接到某个待水解的蛋白质上。此外，有 50 个或更多的泛素分子可形成一个多泛素链与靶蛋白相连，其中每一个泛素分子的 Lys 48 与后一个泛素分子的 C 末端羧基形成异肽键。实际上，多泛素化至少对某些蛋白质的降解是必需的。泛素化的蛋白质是动态性质的，泛素分子被迅速地连上和移去[移去泛素由**泛素异肽酶**(ubiguitin isopeptidase)催化]。

至少天然蛋白质被选定为降解蛋白质的结构特征相当简单。Alexander Varshavsky 发现细胞质中蛋白质的半衰期长短与其 N 末端残基的性质有关，称为 **N 末端规则**(N-end rule)：N 末端为 Asp、Arg、Leu 、Lys 和 Phe 残基的蛋白质半衰期只有 2～3min，而 N 末端为 Ala、Gly、Met、Ser 和 Val 残基的蛋白质，在原核生物中的半衰期超过 10 小时，在真核生物中的半衰期则超过 20 小时。显然，E3 与蛋白质的 N 末端残基相互作用，以此选择进行泛素化。由于 N 末端规则既存在于原核生物也存在于真核生物中，因此这种选择蛋白质进行降解的体系在原核生物和真核生物中是保守的，虽然原核生物中没有泛素。然而，其他更复杂的信号在选择蛋白质降解时也很重要。例如，带有富含 Pro(P)、Glu(E)、Ser(S)和 Thr(T)残基片段的蛋白质可很快地被降解，删除这些称为 **PEST** 序列的片段，可以延长蛋白质的半衰期，但是识别这些信号的方法尚不清楚。同样，细胞选择缺陷蛋白降解的标准也不清楚。

C. 蛋白酶体

泛素化的蛋白质通过一个依赖于ATP的过程被水解，这一过程由很大的(2000kDa, 26S)多蛋白质复合物介导(图20-3)，此复合物被称为**26S蛋白酶体**(26S proteasome)。26S蛋白酶体由一个称为**20S蛋白酶体**(20S proteasome)的中空圆筒形核心组成，两端各覆盖一个19S的“帽子”。酵母的20S蛋白酶体与其他真核生物的20S蛋白酶体十分相似，由7个不同类型的α类亚基和7个不同类型的β类亚基组成。由Robert Huber测定的这个巨大的(6182个残基，700kDa)的蛋白质复合物的X射线结构表明，它由4个堆叠的亚基环组成，其外环和内环分别由7个不同的α型亚基和7个不同的β型亚基组成(图20-4a)。不同的α型亚基折叠成彼此相似的结构，不同的β型亚基也是如此。因此，这个28个亚基的复合物对于两对环而言，具有精确的二重旋转对称，但对每个环内的亚基而言，只具有准七重旋转对称(这个复合物的一半有24 444个非氢原子，使之成为最大的不对称单位，对其结构的了解已到原子水平)。

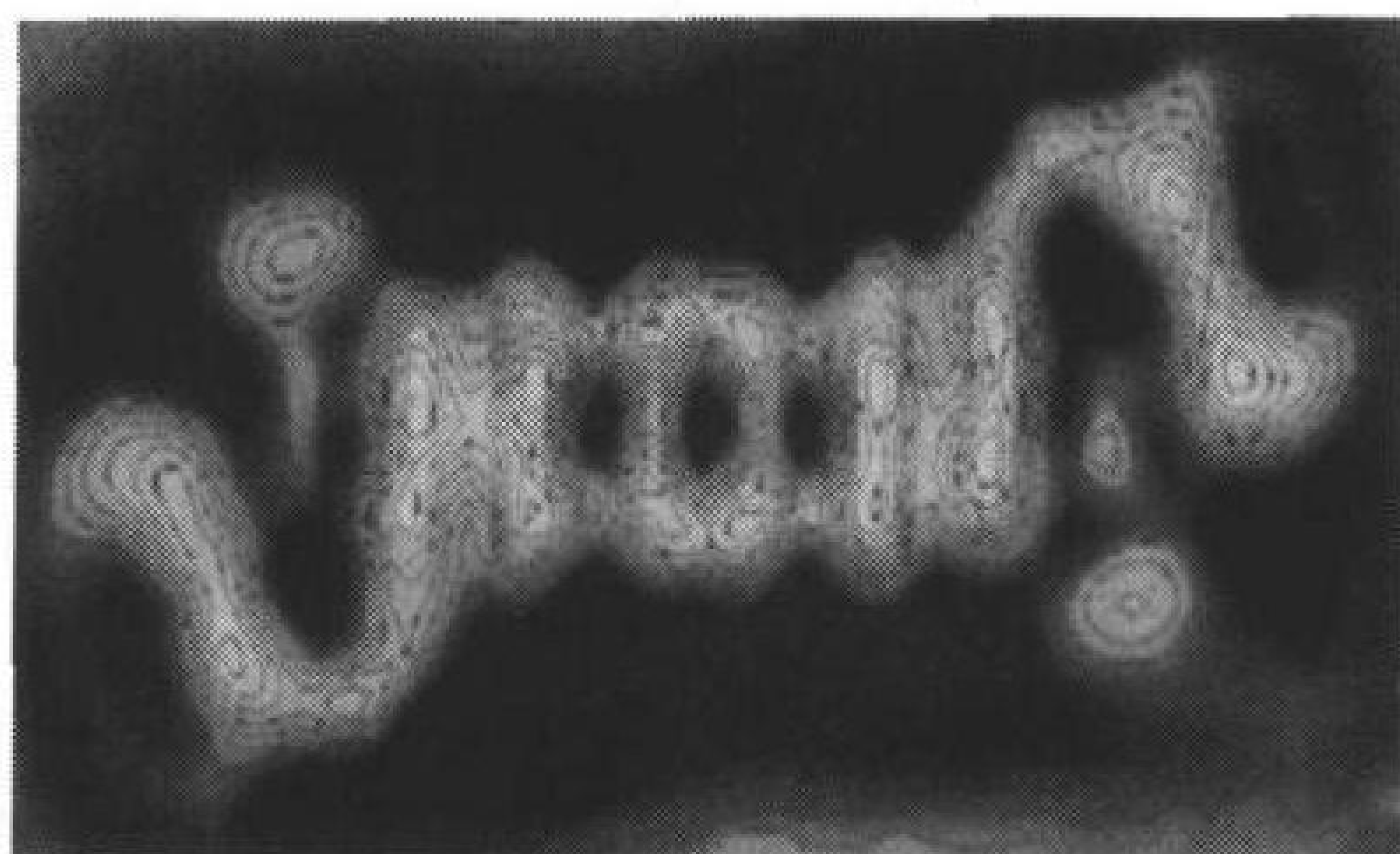
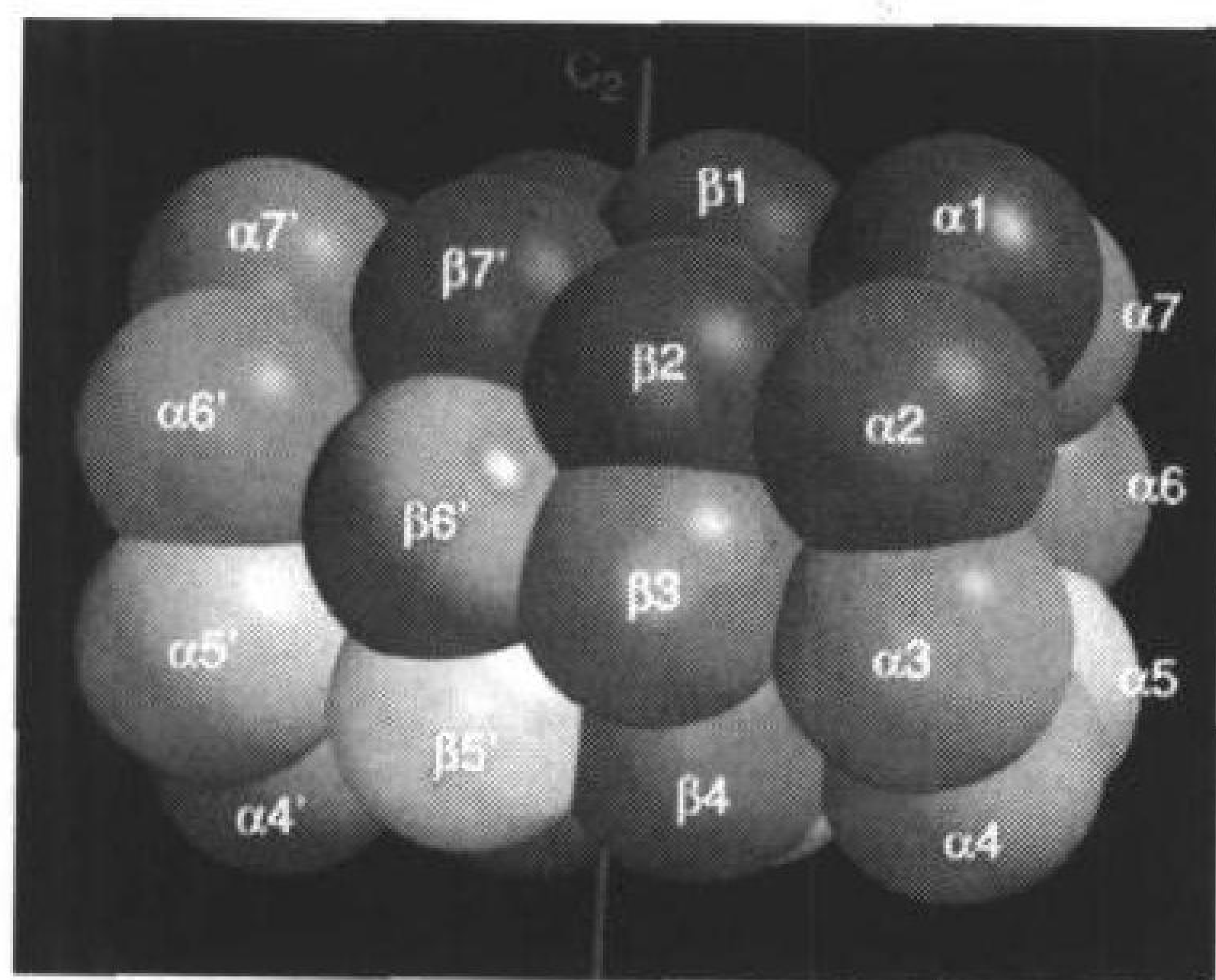
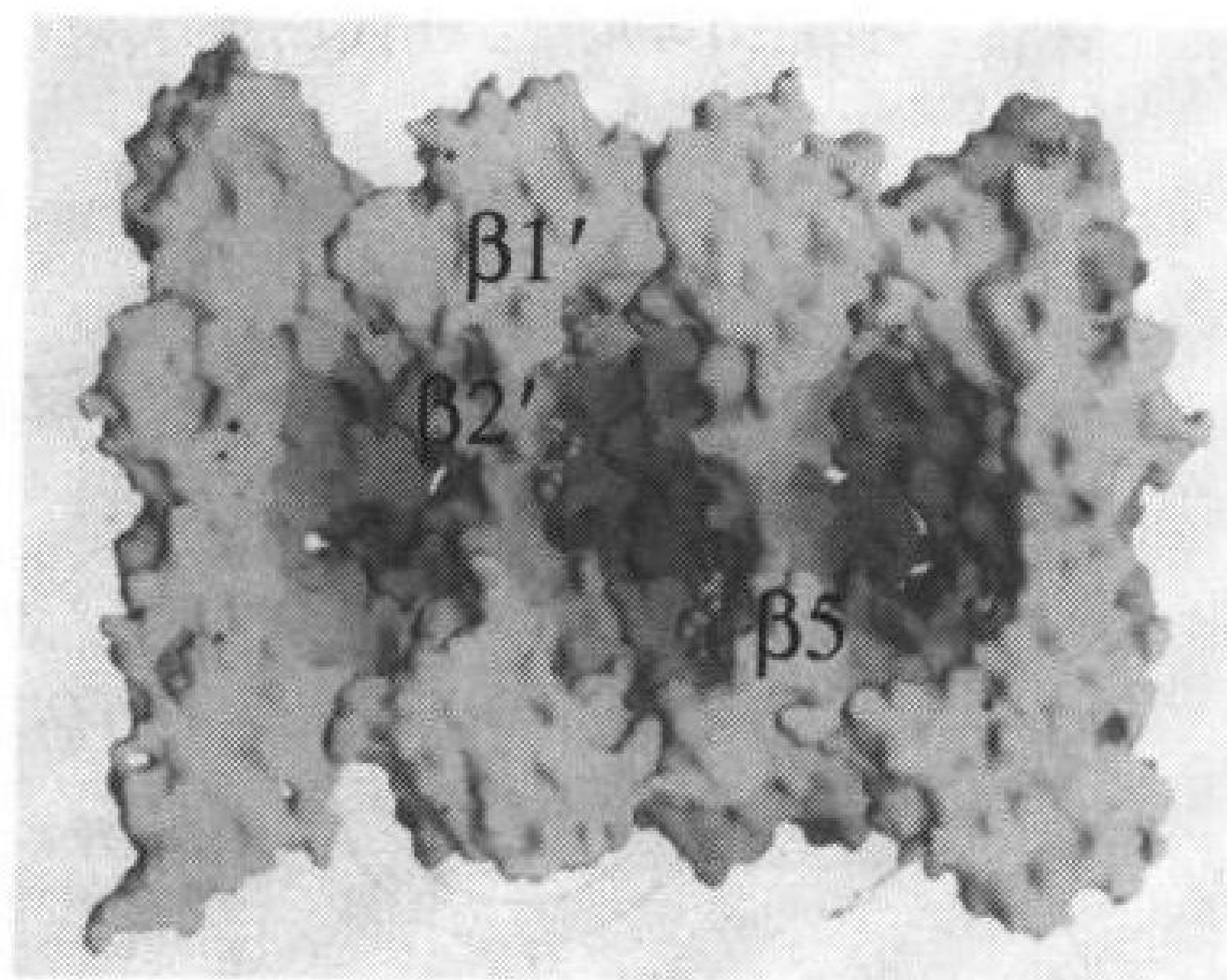


图20-3 26S蛋白酶体的电镜图像
复合物约为450 Å×190 Å，分辨率估计为25 Å。这个二重对称的多蛋白复合物的中心部分，即20S蛋白酶体，是由4个堆叠的七元环亚基组成，形成中空的桶状结构，被泛素标记的蛋白质就在这中空桶内被水解。



(a)



(b)

图20-4 酵母20S蛋白酶体的X射线结构
(a) 28个亚基的排列以球形表示。各由7个亚基组成的四个环相互堆叠形成一个桶状结构(桶的二端在右边和左边)，分别由α型亚基和β型亚基构成外环和内环。复合物的二重对称轴(C_2)用垂直的红色线条表示。(b) 蛋白酶体沿其圆柱体轴切开后的表面观。三个结合的蛋白酶抑制剂分子用红色的空间填满模型表示。

虽然α型亚基和β型亚基在结构上也十分相似，但是只有β型亚基有蛋白水解活性。X射线结构并结合酶学研究发现，β型亚基通过一种尚未完全了解的机制催化肽键水解，这一机制不同于其他已知的蛋白水解酶的水解机制，它涉及β型亚基的N末端Thr残基的参与。其活性位点位于20S蛋白酶体的圆筒之内，从而防止这个杂食性的蛋白质拆卸机器不加选择地水解其附

近的蛋白质。7个不同的β型亚基可能使20S蛋白酶体具有较宽范围的蛋白水解专一性。20S蛋白酶体将其多肽底物切割成约8个残基的片段,随后这些片段扩散到蛋白酶体外。细胞质中的肽酶再将这些小肽降解成氨基酸。但是连接在靶蛋白上的泛素分子并不被降解,而是重新回到细胞中再次利用。

α环中的轴向孔在X射线结构中是关闭的(图20-4b),去折叠的多肽就通过这些孔进入20S蛋白酶体的水解腔。这表明26S蛋白酶体的19S帽子(已证明它可活化20S蛋白酶体),通过诱导其α环的构象变化来控制进入20S蛋白酶体的通道。而且,由于泛素化蛋白质的ATP依赖性降解是由26S蛋白酶体介导的,而20S蛋白酶体只以不依赖于ATP的方式水解去折叠的蛋白质,因此19S帽子结构也起选择并去折叠进入的泛素化蛋白质底物的作用。虽然蛋白酶体存在于所有细胞中,但是原核生物没有泛素,并且只含有20S蛋白酶体。

2. 氨基酸脱氨

游离氨基酸来自细胞内蛋白质的降解以及食物中蛋白质的消化。胃中的蛋白酶**胃蛋白酶**(pepsin)、胰脏中的胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和弹性蛋白酶(见节5-3B和节11-5)以及其他多种内肽酶和外肽酶将多肽降解为寡肽和氨基酸。这些物质由小肠黏膜吸收,并经血液循环转运至其他组织而被吸收。

氨基酸的进一步降解发生在细胞内,包括将去除α-氨基这一步。许多情况下,氨基出现在谷氨酸中,然后再被掺入到尿素中排出体外(见节20-3)。氨基酸剩下的碳骨架(α-酮酸)可被降解成其他化合物(见节20-4)。这种代谢模式概括在图20-5中。

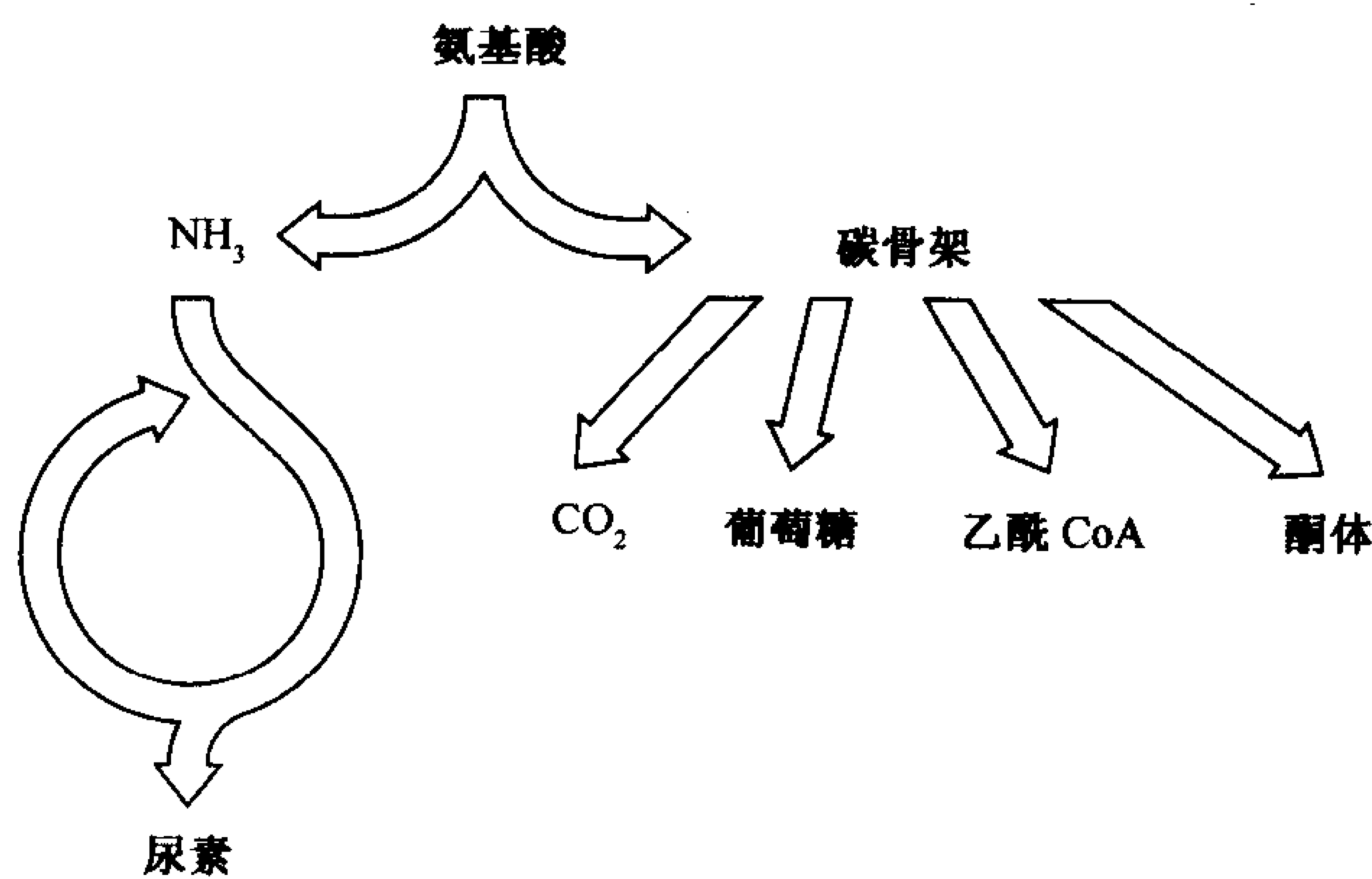
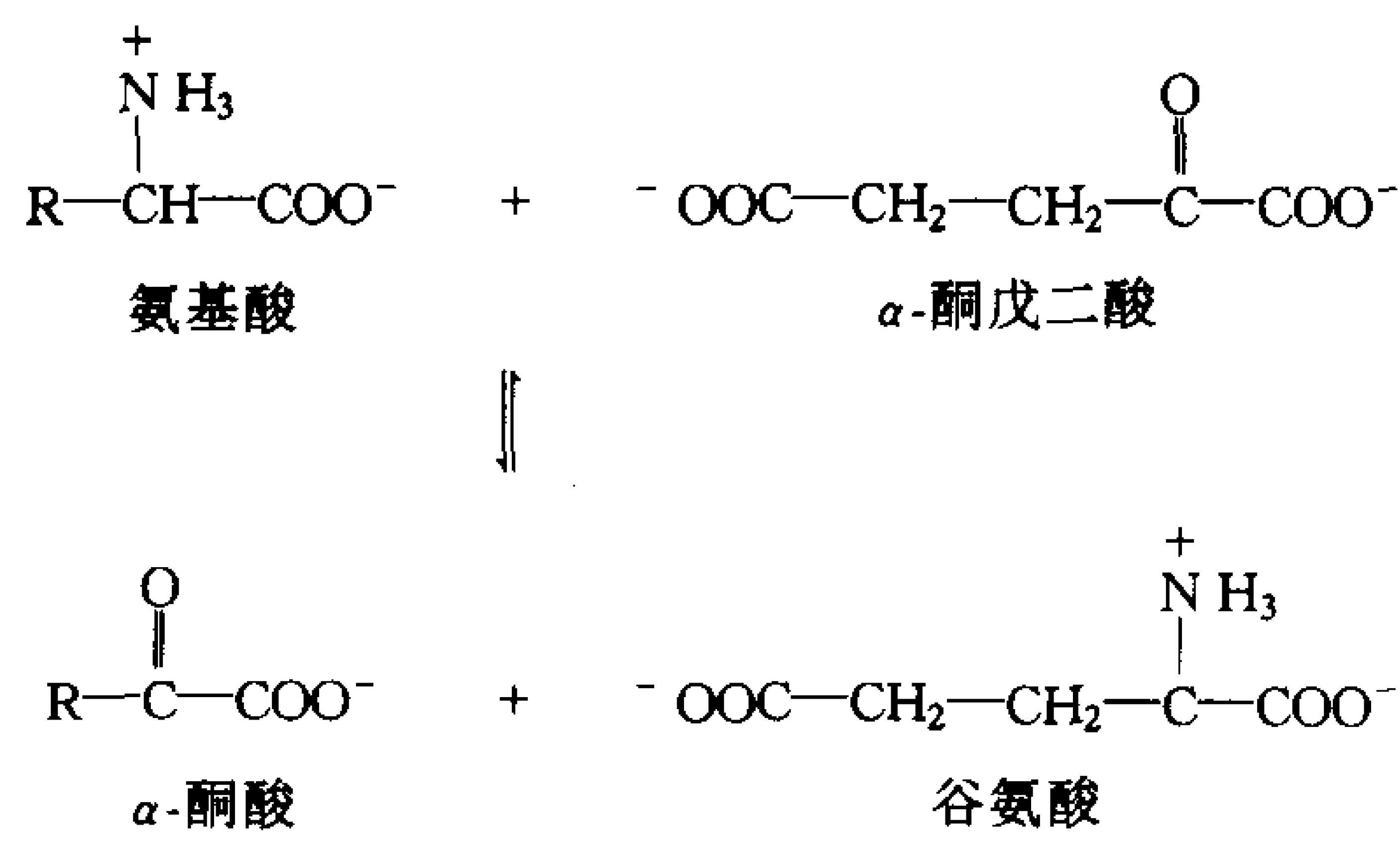


图20-5 氨基酸代谢的总观

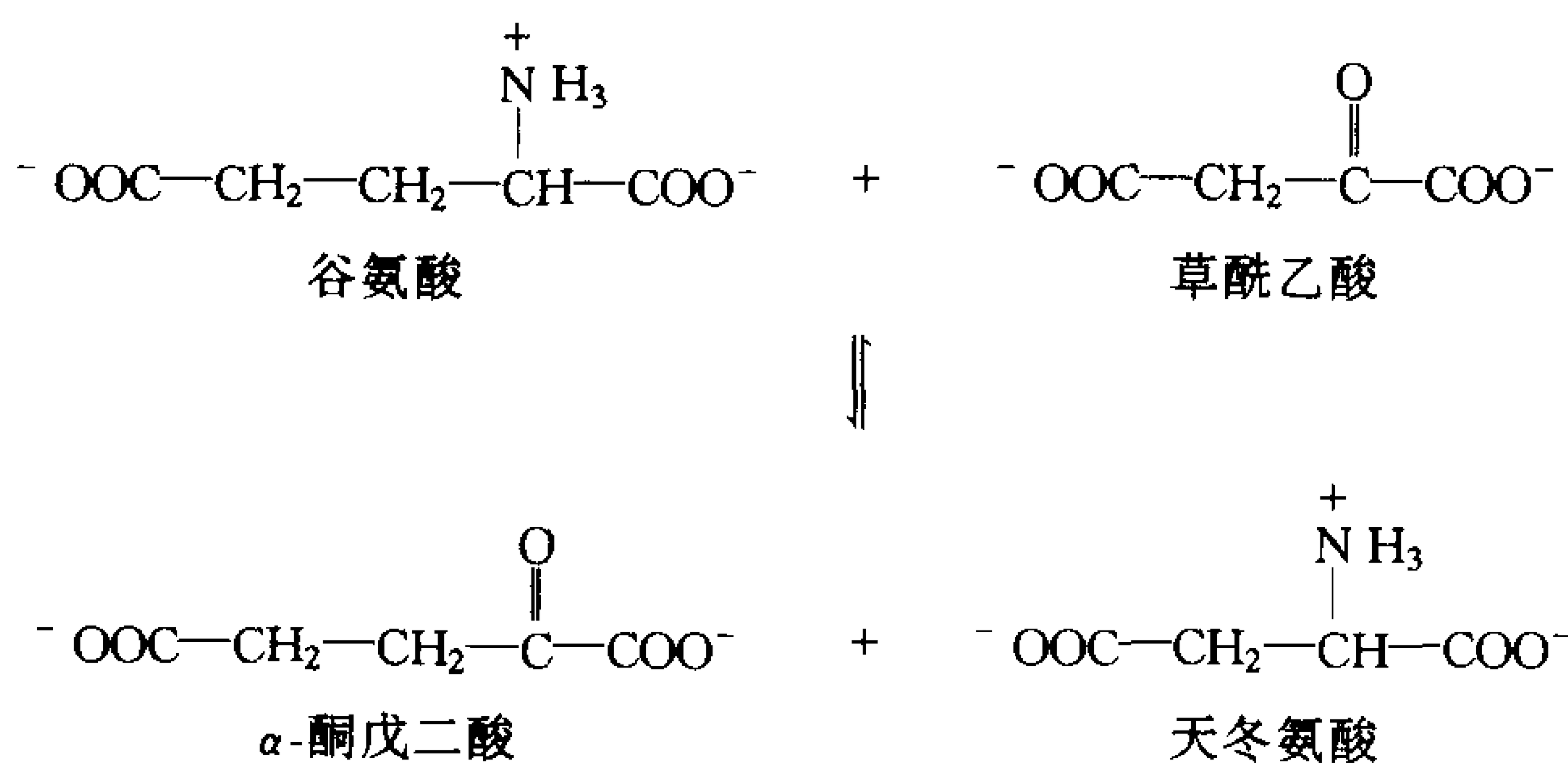
氨基被移去,并掺入到尿素中排出。剩下的碳骨架(α-酮酸)可被降解为CO_2和H_2O,也可以转化为葡萄糖、乙酰CoA或酮体。

A. 转氨作用

大多数氨基酸通过**转氨作用**(transamination)脱氨,即将其氨基转移给一个α-酮酸生成原氨基酸的α-酮酸和一种新的氨基酸。主要的氨基受体是α-酮戊二酸,可以产生谷氨酸和新的酮酸:



然后谷氨酸中的氨基再经第二个转氨反应转移给草酰乙酸，产生天冬氨酸，再生成 α-酮戊二酸：



催化转氨作用的酶称为**氨基转移酶**(amino-transferase)或**转氨酶**(transaminase)，它需要辅酶 617 **吡哆醛-5′-磷酸**(pyridoxal-5′-phosphate, PLP；图 20-6a)。PLP 是**吡哆醇**[pyridoxine, **维生素 B_6**

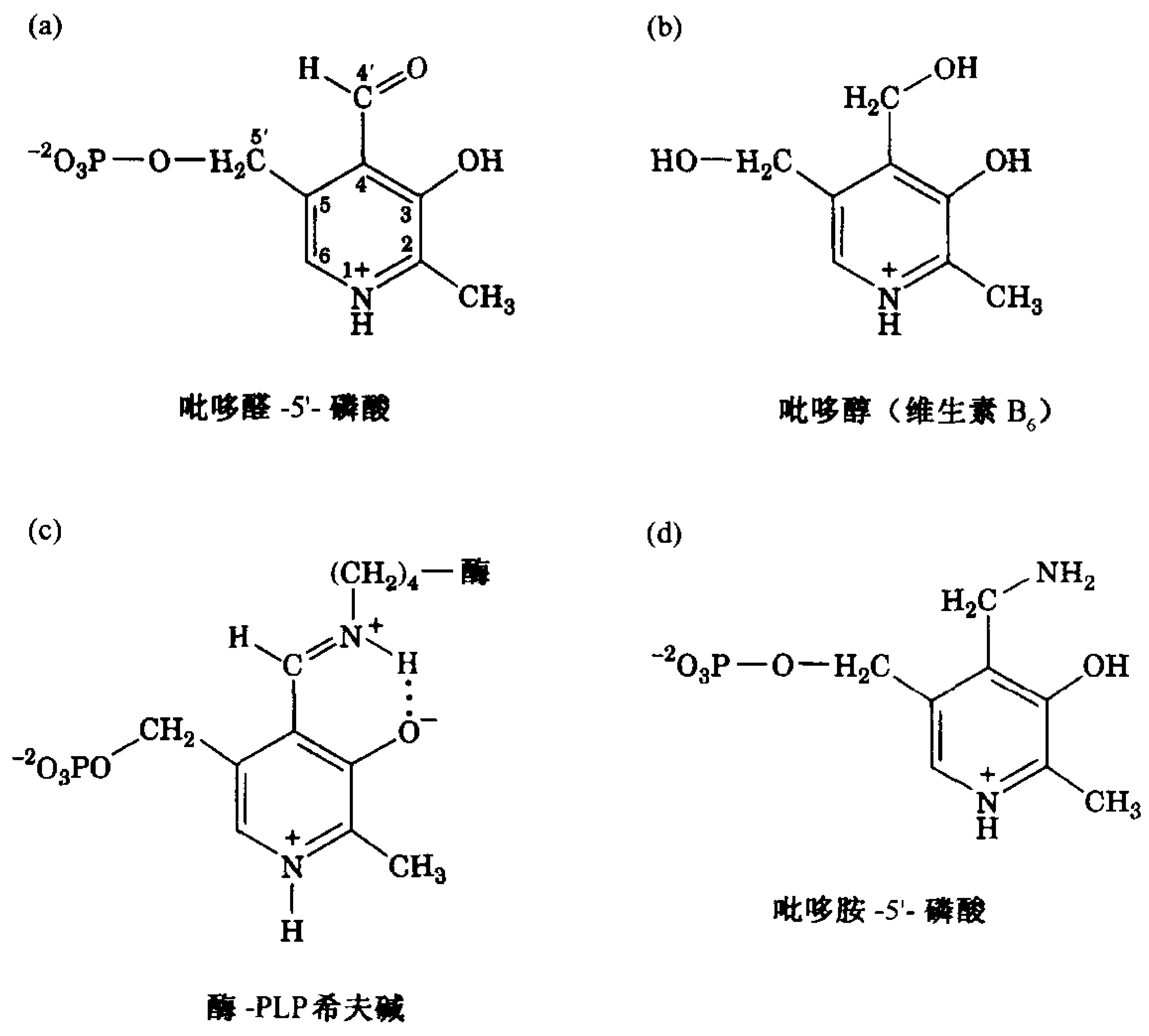


图 20-6 吡哆醛-5′-磷酸的几种形式

(a)辅酶吡哆醛-5′-磷酸(PLP)。(b)吡哆醇(维生素 B_6)。(c)在 PLP 和酶的一个 ε-氨基之间形成的希夫碱。(d)吡哆胺-5′-磷酸(PMP)。

(vitamin B_6);图 20-66]的衍生物。辅酶通过希夫碱(亚胺)连键与酶共价相连(图 20-6c)。此连键由希夫碱的醛基与酶的一个 Lys 残基的 ε-氨基缩合生成。希夫碱与吡啶环共轭,是辅酶的活性中心。当 PLP 接受来自一个氨基酸的氨基时,PLP 就转变为**吡哆胺-5′-磷酸**(pyridoxamine-5′-phosphate, PMP, 图 20-6d)。

Esmond Snell、Alexander Braunstein 和 David Metzler 证明转氨反应是按乒乓反应机制(见节

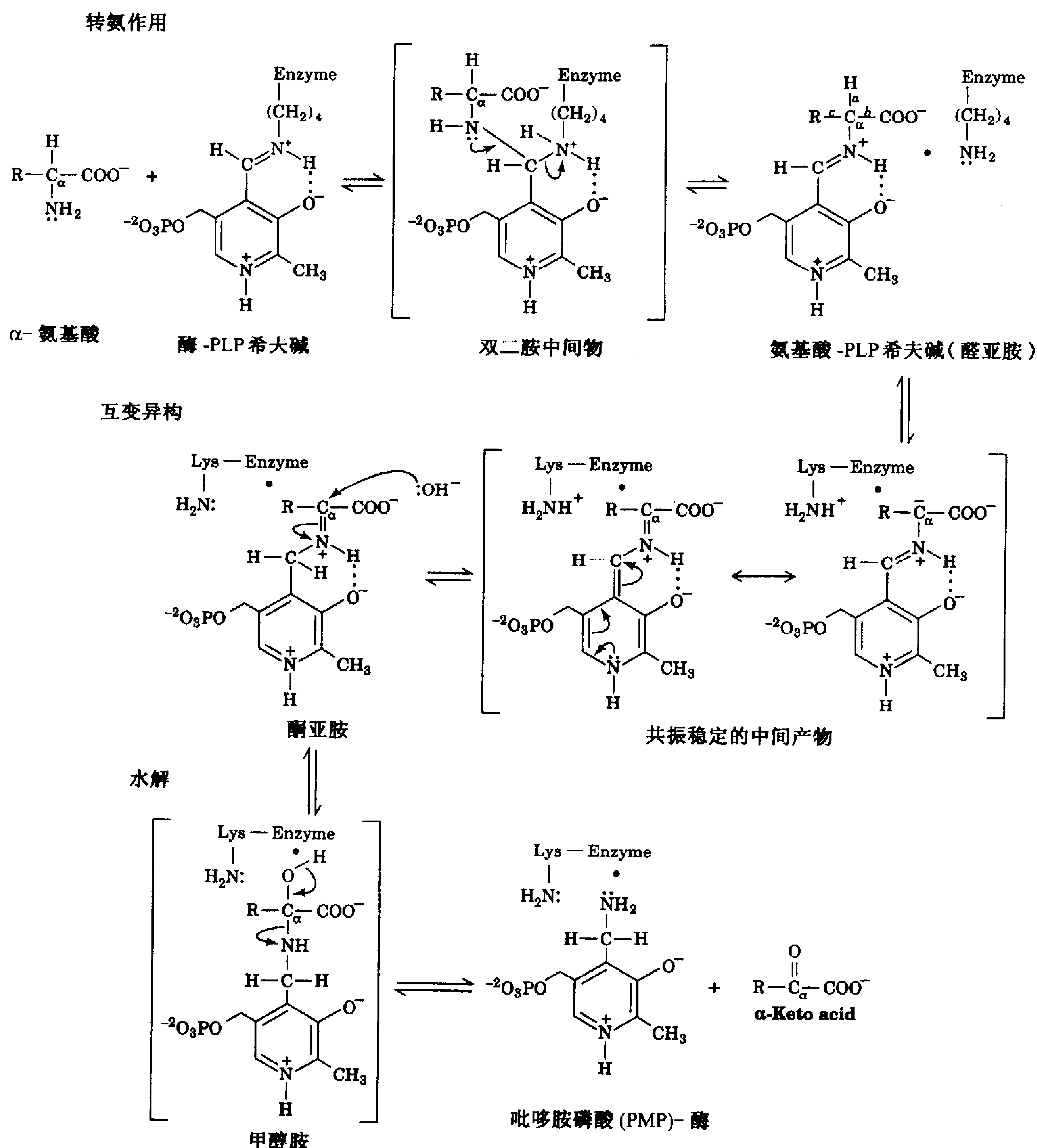


图 20-7 *功能的秘诀*:依赖于 PLP 的酶促转氨反应的机制

反应第一阶段中,氨基酸的 α-氨基被转移给 PLP,产生 α-酮酸和 PMP,该阶段包括 3 步反应:(1) 转氨作用。(2) 互变异构作用,转氨反应中释放的 Lys 作为通用的酸-碱催化剂起作用。(3)水解作用。反应的第二阶段,PMP 的氨基被转移给另一种α-酮酸,产生一种新的α-氨基酸和PLP,这个阶段本质上是第一阶段的逆过程,而反应3′、2′和 1′,则分别是反应 3、2 和 1 的逆反应。

12-1D)进行的,反应分二个阶段,每个阶段各由 3 步反应组成(图 20-7):

第一阶段:氨基酸转化为酮酸

1) 氨基酸的亲核性氨基在**转亚胺**(transimination)反应中进攻酶-PLP 希夫碱的碳原子,形成氨基酸-希夫碱(醛亚胺),伴有酶的 Lys 氨基释放。此 Lys 可在活性中心自由地起一般碱的作用。

2) 在活性中心 Lys 的催化下,通过共振稳定的碳负离子中间产物去除氨基酸的 α-氢,并且使 PLP 的 C4′原子质子化,从而使氨基酸-PLP 希夫碱互变异构为 α-酮酸-PMP 希夫碱(酮亚胺)。这种共振稳定化有助于 C_α—H 键的断裂。

3) α-酮酸-PMP 希夫碱被水解为 PMP 和 α-酮酸。

第二阶段:α-酮酸转化为氨基酸

619

为了完成氨基转移酶的催化循环,辅酶必须从 PMP 转回为酶-PLP 希夫碱。这涉及相同的 3 步反应,但是顺序相反:

3′) PMP 与 α-酮酸反应生成希夫碱。

2′) α-酮酸-PMP 希夫碱互变异构生成氨基酸-PLP 希夫碱。

1′) 活性中心 Lys 残基的 ε-氨基在转亚胺反应中进攻氨基酸-PLP 希夫碱,再生有活性的酶-PLP 希夫碱,并释放出新生成的氨基酸。

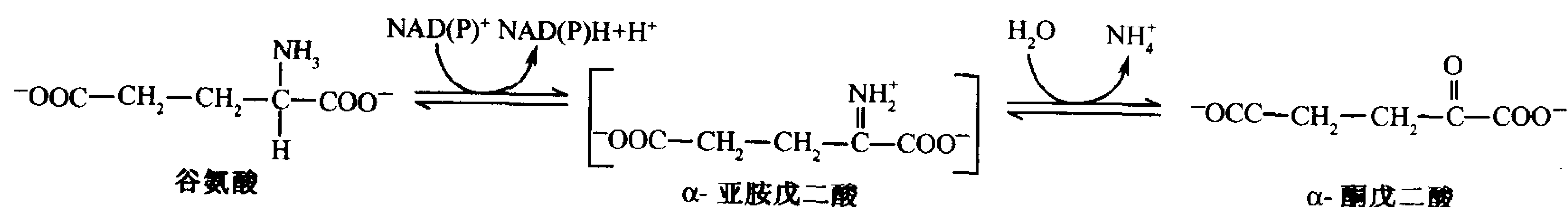
注意,去除底物氨基酸的氨基后产生了一个共振稳定的 C_α 碳负离子,其电子可以不受限制地一路到达辅酶的质子化的吡哆环氮原子,也就是说,PLP *起到电子槽的功能*。对于转氨反应,这种吸引电子的能力有助于在互变异构时去除 α 质子(a 键断裂,图 20-7 右上部)。在涉及 b 和 c 键断裂的酶促反应中,PLP 的作用与此相似。

各种氨基转移酶在转氨反应的第一阶段对氨基酸底物的专一性不同,因此产生相应的不同的 α-酮酸产物。但是,大多数氨基转移酶在反应的第二阶段只能接受 α-酮戊二酸,或者(程度较低)草酰乙酸为 α-酮酸底物,因此只能产生谷氨酸或天冬氨酸为其氨基酸产物。*这样,大多数氨基酸的氨基就被集中到谷氨酸或者天冬氨酸中了。*

B. 氧化脱氨

当然,转氨作用并不导致任何净脱氨。但是谷氨酸可以被**谷氨酸脱氢酶**(glutamate dehydrogenase)氧化脱氨,产生氨并再生 α-酮戊二酸用于新的转氨反应。

谷氨酸脱氢酶是一种线粒体酶,也是惟一一种已知的既可接受 NAD^+ 也可接受 $NADP^+$ 作为其氧还辅酶的酶。氧化作用被认为是从谷氨酸的 C_α 转移一个氢负离子给 $NADP^+$,生成 α-亚胺戊二酸,后者再水解生成 α-酮戊二酸和氨:



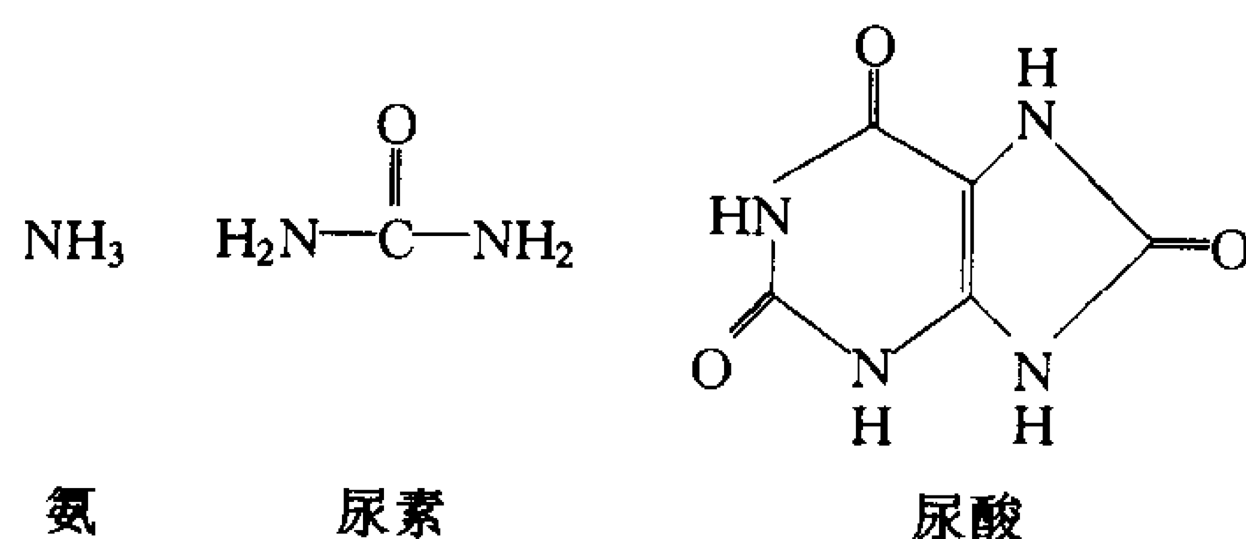
这个反应的 $\Delta G^{\circ\prime}$ 约为 $30\mathrm{kJ\cdot mol^{-1}}$,但是在体内谷氨酸脱氢酶的作用接近平衡($\Delta G \approx 0$)。反应的流向可能由底物和产物的浓度控制。因为高浓度的氨有毒,所以平衡位置具有生理上的

重要性。产生的氨被转化为尿素排出。

620

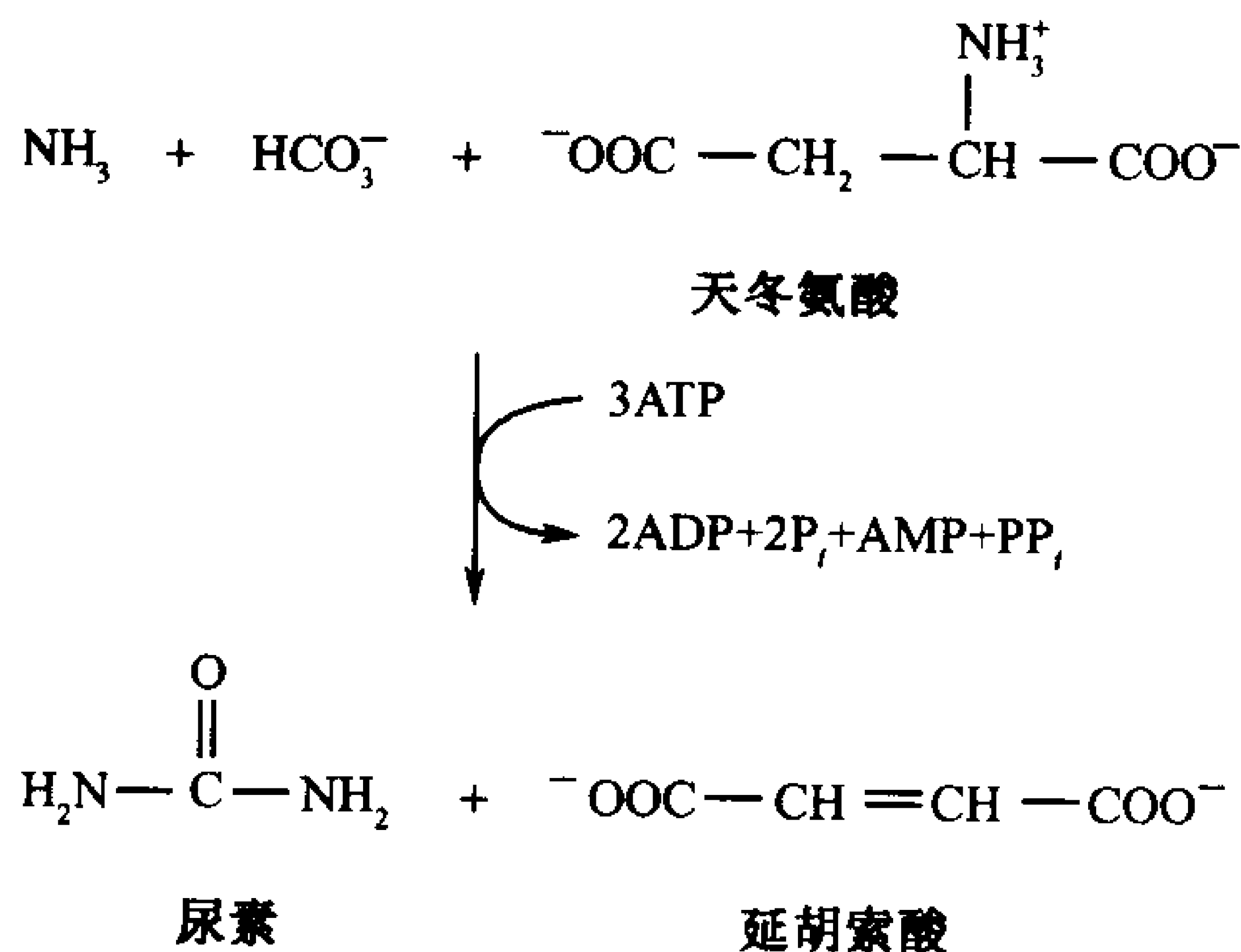
3. 尿素循环

活有机体通过三种方式中的一种排出来自氨基酸降解代谢的过量的氮。许多水生动物简单地排出氨。但是，当水不很充足时，就需要一个过程将氨转化为毒性较低的废物，这样排泄时需要的水就少一些。产物之一就是尿素，由大多数陆生脊椎动物产生，另一种是**尿酸**(uric acid)，由鸟类和陆生爬行动物排泄。



在这一节，我们集中讨论尿素的生成。尿酸的生物合成将在节 22-4A 中讨论。

尿素由**尿素循环**(urea cycle)的酶在肝脏中合成。然后被分泌到血液中，并被肾脏截留随尿液排出体外。尿素循环在 1932 年由 Hans Krebs 和 Kurt Henseleit 阐明(这是第一条被了解的代谢循环；Krebs 直到 1937 年才阐明柠檬酸循环)。尿素循环中的个别反应后来由 Sarah Ratner 和 Philip Cohen 作了详细描述。尿素循环的总反应是：



由此可知，尿素的 2 个氮原子是由氨和天冬氨酸提供的，而其碳原子来自于 HCO_3^-。

A. 尿素循环中的各个反应

尿素循环涉及 5 个酶促反应，其中 2 个发生在线粒体，3 个发生在细胞质中(图 20-8)。

622

1) 氨甲酰磷酸合成酶：获得尿素分子中的第一个氮原子

氨甲酰磷酸合成酶(carbamoyl phosphate synthetase, CPS)严格说来不属于尿素循环的成员。它催化 NH_4^+ 和 HCO_3^- 的缩合和活化，生成**氨甲酰磷酸**(carbamoyl phosphate)，这是循环中第一个含 1 个氮原子的底物①，反应的同时裂解了 2 分子 ATP。真核生物中有两种形式的 CPS：线粒

① 原文为 2，但氨甲酰磷酸只有一个 N 原子。——译者注

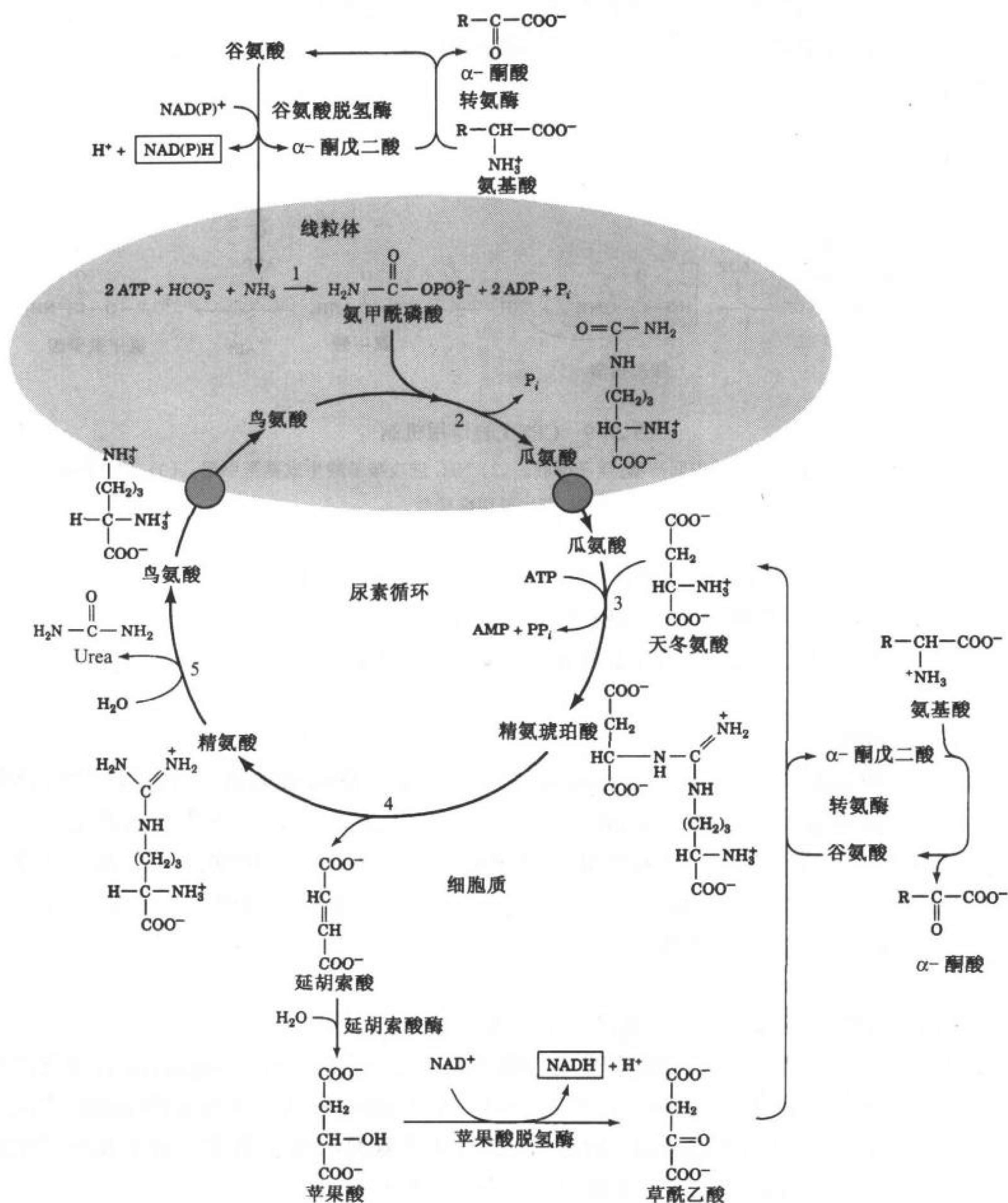


图 20-8 代谢的秘诀：尿素循环

5种酶参与了尿素循环：(1) 氨甲酰磷酸合成酶。(2) 鸟氨酸转氨甲酰酶。(3) 精氨琥珀酸合成酶。(4) 精氨琥珀酸酶和(5)精氨酸酶。酶1和2位于线粒体中，而酶3～5在细胞质中。因此鸟氨酸和瓜氨酸必须经由特定的转运系统(黄圈)跨越线粒体膜转运。尿素中的氨基来源于氨基酸的脱氨作用。一个氨基(绿色)来自氨，是由谷氨酸脱氢酶反应(上部)产生的。另一个氨基(红色)是通过转氨作用(右边)从一种氨基酸转移给草酰乙酸的。草酰乙酸是从精氨琥珀酸酶反应的产物——延胡索酸衍生而来的，这个反应与柠檬酸循环中的反应相似，但发生在细胞质中(底部)。

体 **CPSI**，以氨作为其氮的供体，参与尿素的生物合成，而细胞质 **CPSII**，以谷氨酰胺作为其氮供体，在嘧啶的生物合成中起作用(见节 22-2A)。CPS I 催化一个不可逆反应，这是尿素循环的限速步骤(图 20-9)：

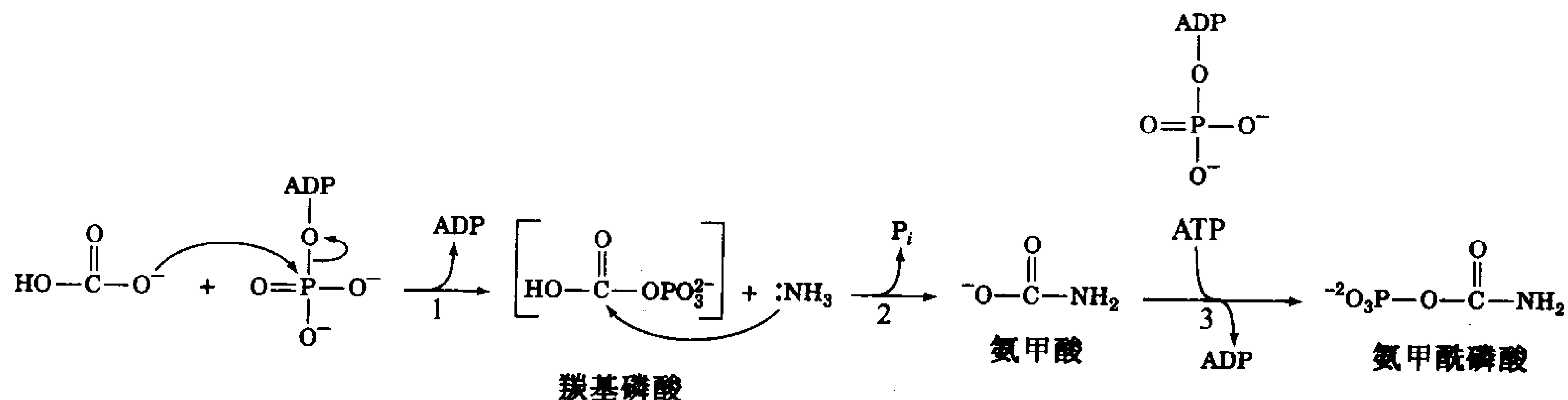


图 20-9　CPS I 的作用机制

(1) 磷酸化激活 HCO_3^- 形成推测的中间产物：羰基磷酸。(2) NH_3 进攻羰基酸生成氨基甲酸。(3) ATP 磷酸化氨基甲酸，产生氨甲酰磷酸。

① ATP 活化 HCO_3^- 生成**羰基磷酸**(carbonyl phosphate)和 ADP。
② 氨进攻羰基磷酸，置换磷酸生成**氨甲酸**(carbamate)和 P_i。
③ 第二个 ATP 使氨甲酸磷酸化，生成氨甲酰磷酸和 ADP。

2) 鸟氨酸转氨甲酰酶

鸟氨酸转氨甲酰酶(ornithine transcarbamoylase)将氨甲酰磷酸的氨甲酰基转移给**鸟氨酸**(ornithine)，产生**瓜氨酸**(citrulline)(图 20-8，反应 2)。注意，后面的这两个化合物都是"非标准"α-氨基酸，不会在蛋白质中出现。转氨甲酰酶催化的反应发生在线粒体中，因此，在细胞质中产生的鸟氨酸必须通过一个特定的转运系统进入线粒体。同样，由于尿素循环其余的反应在细胞质中进行，因此瓜氨酸必须从线粒体中转运出来。

3) 精氨琥珀酸合成酶：尿素中第二个氮原子的获得

尿素分子中第二个氮原子是由**精氨琥珀酸合成酶**(argininosuccinate synthetase)催化的瓜氨酸的脲基与天冬氨酸的氨基缩合引入的(图 20-10)。ATP 通过形成一个瓜氨酰-AMP 中间产物而活化脲基氧原子，使之成为离去基团，然后 AMP 被天冬氨酸的氨基取代。这个反应中生成的 PP_i 被水解为 $2P_i$，因此这步反应相当于消耗了 2 分子 ATP。

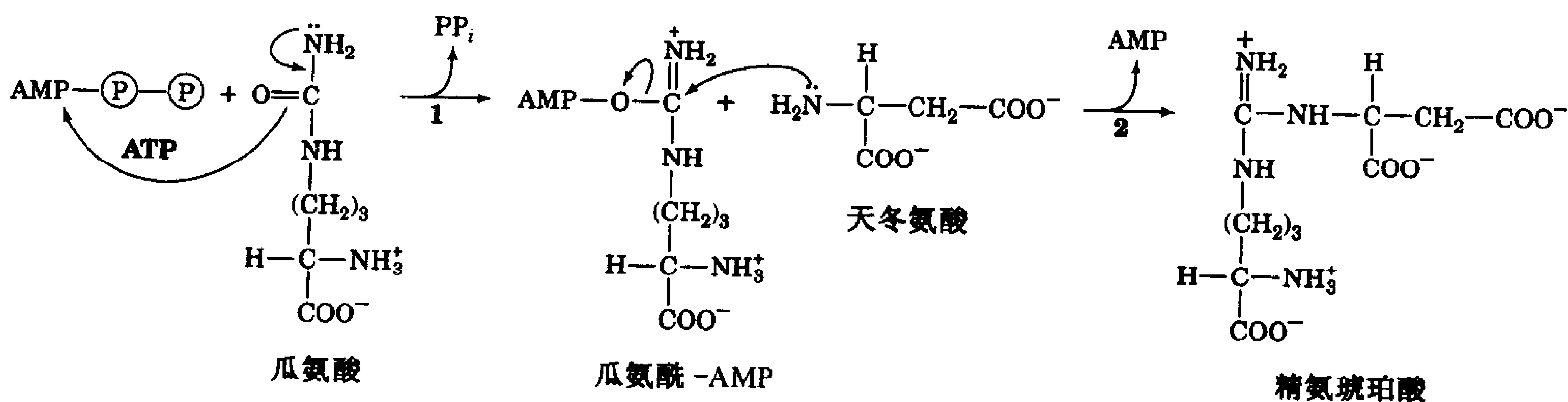


图 20-10　精氨琥珀酸合成酶的作用机制

(1) 瓜氨酰-AMP 的形成活化了瓜氨酸的脲基氧原子。(2) 天冬氨酸的 α-氨基取代了 AMP。

4）精氨琥珀酸酶

随着精氨琥珀酸的生成，尿素循环中所有的组分都已凑成。但是，由天冬氨酸提供的氨基仍然还连在天冬氨酸的碳骨架上。于是由**精氨琥珀酸酶**(argininosuccinase)催化，移去延胡索酸，留下精氨酸(图 20-8，反应 4)。精氨酸是尿素的直接前体。在精氨琥珀酸反应中产生的延胡索酸可被重新转化为天冬氨酸，用于精氨琥珀酸合成酶催化的反应(图 20-8，右下部)。这种转化是通过延胡索酸酶和苹果酸脱氢酶反应生成草酰乙酸，再经转氨作用生成天冬氨酸。前两步反应与发生在柠檬酸循环中的反应相似，但是它们发生在细胞质中而不是发生在线粒体中。 623

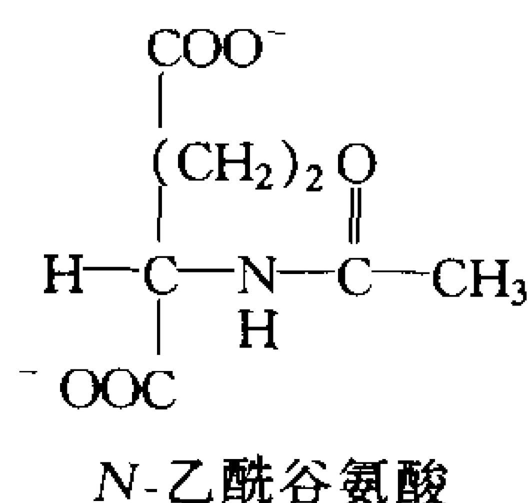
5）精氨酸酶

尿素循环中的最后一个反应是**精氨酸酶**(arginase)催化的精氨酸的水解，产生尿素，并再生鸟氨酸(图 20-8，反应 5)，然后鸟氨酸重新回到线粒体中准备进行下一轮循环。

尿素循环由此将两个氨基，一个来自氨，一个来自天冬氨酸，以及一个来自 HCO_3^- 的碳原子转化为相对无毒的产物：尿素，同时消耗了 4 个“高能”磷酸键。然而，消耗的能量比生成尿素循环底物时得到的能量少[①]。CPS I 的氨基底物是谷氨酸脱氢酶反应的产物，同时产生NAD(P)H(图 20-8，左上部)。将延胡索酸重新转化为草酰乙酸也可以产生 NADH(图 20-8，右下部)。这些还原型辅酶在线粒体中重新氧化可以产生 6 个 ATP。

B. 尿素循环的调控

催化尿素循环的第一个限速步骤的氨甲酰磷酸合成酶 I 可以被 ***N*-乙酰谷氨酸**(*N*-acetylglutamate)(见右图)别构活化。该代谢物是由 ***N*-乙酰谷氨酸合酶**(*N*-acetylglutamate synthase)从谷氨酸和乙酰 CoA 催化合成的。当氨基酸降解速度增加时，作为转氨作用的结果，谷氨酸的浓度也随之增加。谷氨酸量的增加促进了 *N*-乙酰谷氨酸的合成，结果活化了氨甲酰磷酸合成酶，使尿素合成速度加快。因此由氨基酸降解产生的过量的氮，就被有效地排出体外。



N-乙酰谷氨酸

尿素循环中其余的酶受其底物浓度的调控。尿素循环中除精氨酸酶外其他酶有遗传缺陷的个体，相应的底物就会在体内累积，从而使缺陷反应速度增加，结果尿素的生成速度是正常的(完全缺少某种尿素循环中的酶却是致命的)。但是底物的异常积累并不是没有代价的，底物浓度增加促使循环向氨转移，导致**高血氨症**(hyperammonemia)(即血液中氨水平增加)。虽然氨毒性的根本原因尚未完全了解，但是很清楚脑对高氨浓度尤其敏感(尿素循环中酶缺陷的症状包括智力迟钝和嗜眠症)。 624

4. 氨基酸的降解

氨基酸降解产生的化合物可以代谢为 CO_2 和 H_2O，或者用于葡萄糖异生。实际上，氨基酸的氧化降解，典型的可占到动物通过代谢产生能量的 10%～15%。在这一节中我们将介绍 20 种“标准”氨基酸的碳骨架是如何被分解代谢的，但是我们不详细介绍所涉及的众多反应的细节，

① 原文为“多”。——译者注

而是介绍这些代谢途径是如何组织的，并着重介绍少数几个在化学和/或医学上受关注的反应。

"标准"氨基酸被降解为七种代谢中间物中的一种：丙酮酸、α-酮戊二酸、琥珀酰 CoA、延胡索酸、草酰乙酸、乙酰 CoA 或乙酰乙酸(图 20-11)。因此，根据其分解代谢途径的差异，可以将氨基酸分为两类：

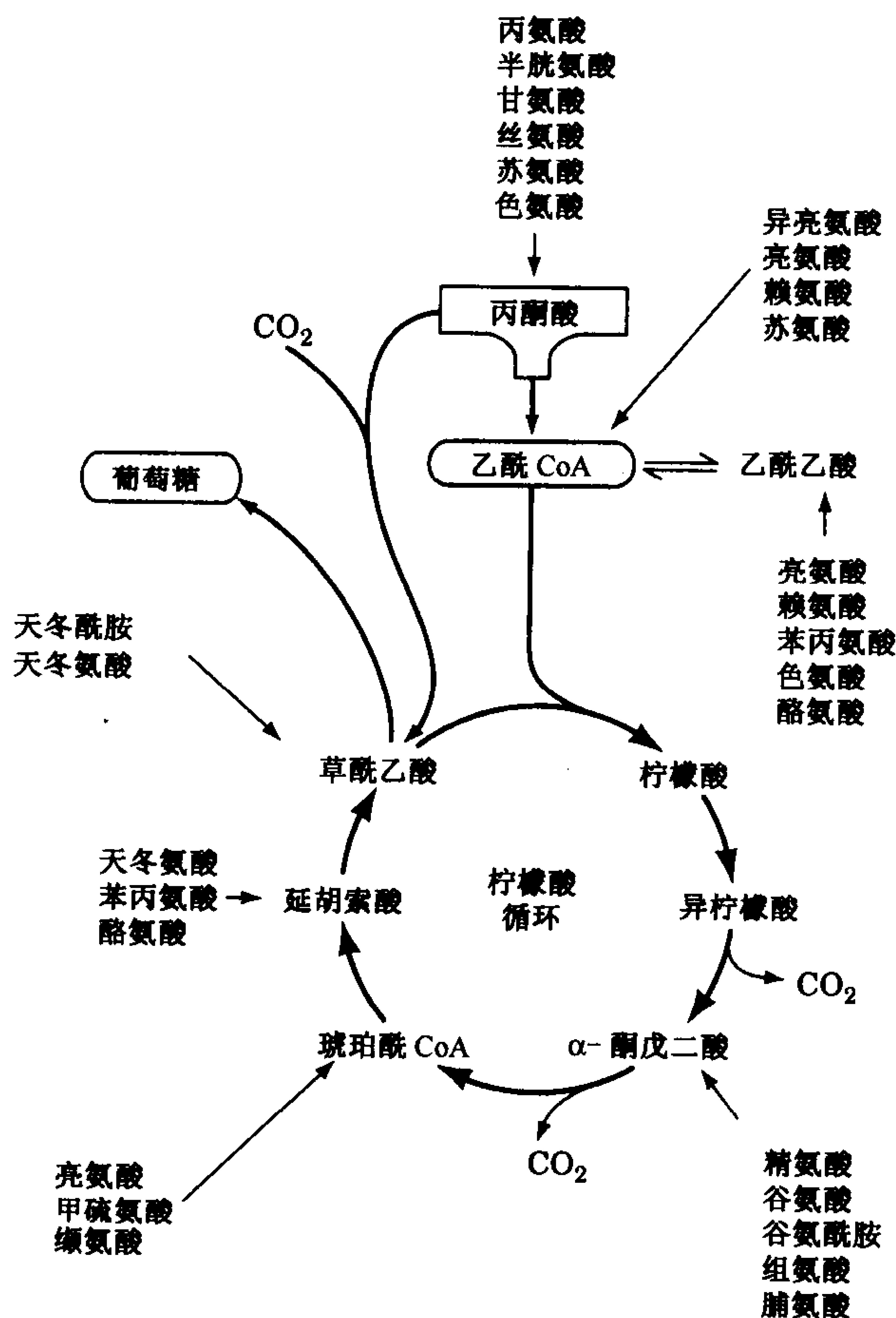


图 20-11 氨基酸被降解为 7 种常见的分解代谢中间产物之一
生糖和生酮降解分别用绿色和红色表示。

1) **生糖氨基酸**(glucogenic amino acids)，被降解为丙酮酸、α-酮戊二酸、琥珀酰 CoA、延胡索酸或草酰乙酸，作为葡萄糖的前体(节 15-4)。

625

2) **生酮氨基酸**(ketogenic amino acids)，被降解为乙酰 CoA 或乙酰乙酸，因而可以转化为脂肪酸或酮体(节 19-3)。

有些氨基酸既是糖也是酮体的前体。因为动物体内缺少将乙酰 CoA 或乙酰乙酸净转化为糖异生前体的代谢途径，因此，*不可能从纯粹的生酮氨基酸净生成糖*。

在研究氨基酸降解的特定途径时，我们将把氨基酸按它们降解为上述 7 种代谢产物之一的情况分类。

A. 丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸被降解为丙酮酸

626

5 种氨基酸——丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸——被降解产生丙酮酸(图 20-12)。丙氨酸直接转氨生成丙酮酸。丝氨酸被**丝氨酸脱水酶**(serine dehydratase)脱水转化为丙酮酸,该酶是一个依赖于 PLP 的酶,像氨基转移酶一样(见节 20-2A)可以形成 PLP-氨基酸 Schiff 碱,以利于去除氨基酸的 α-氢原子。但是在丝氨酸脱水酶反应中,氨基酸 C_β OH 的消除使 C_α 碳负离子裂解,而不是互变异构(图 20-7,第二步),因此底物上进行的是 α、β 位消去 H_2O 而不是脱氨(图 20-13)。脱水的产物是烯胺,**氨基丙烯酸**(aminoacrylate),可以非酶促异构化为相应的亚胺,后者可以自发地水解为丙酮酸和氨。

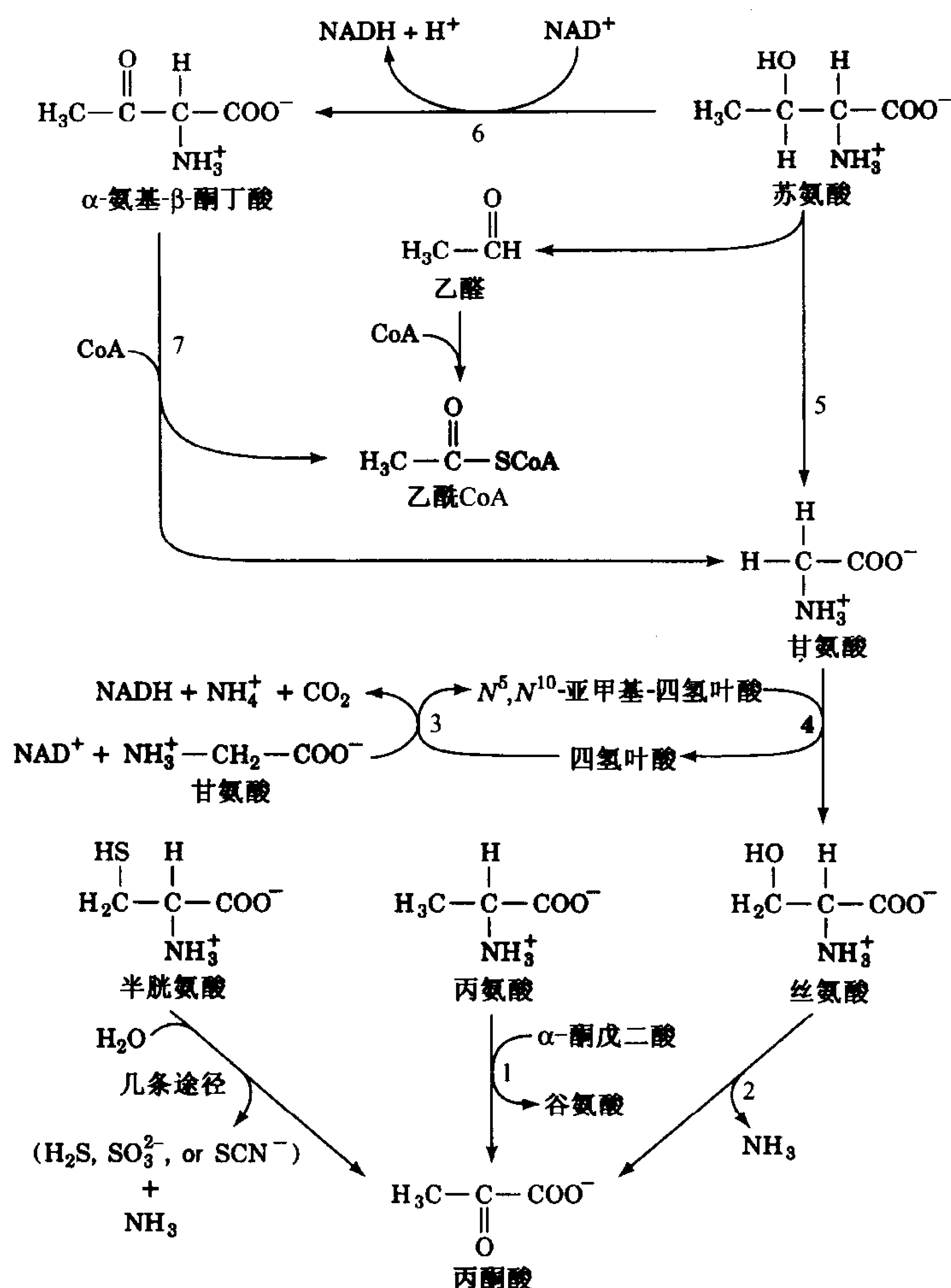


图 20-12　丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸转化为丙酮酸的途径
涉及的酶是(1) 丙氨酸氨基转移酶。(2) 丝氨酸脱水酶。(3) 甘氨酸裂解体系。(4) 和(5)丝氨酸羟甲基转移酶。(6) 苏氨酸脱氢酶,以及(7)α-氨基-β-酮丁酸裂解酶。

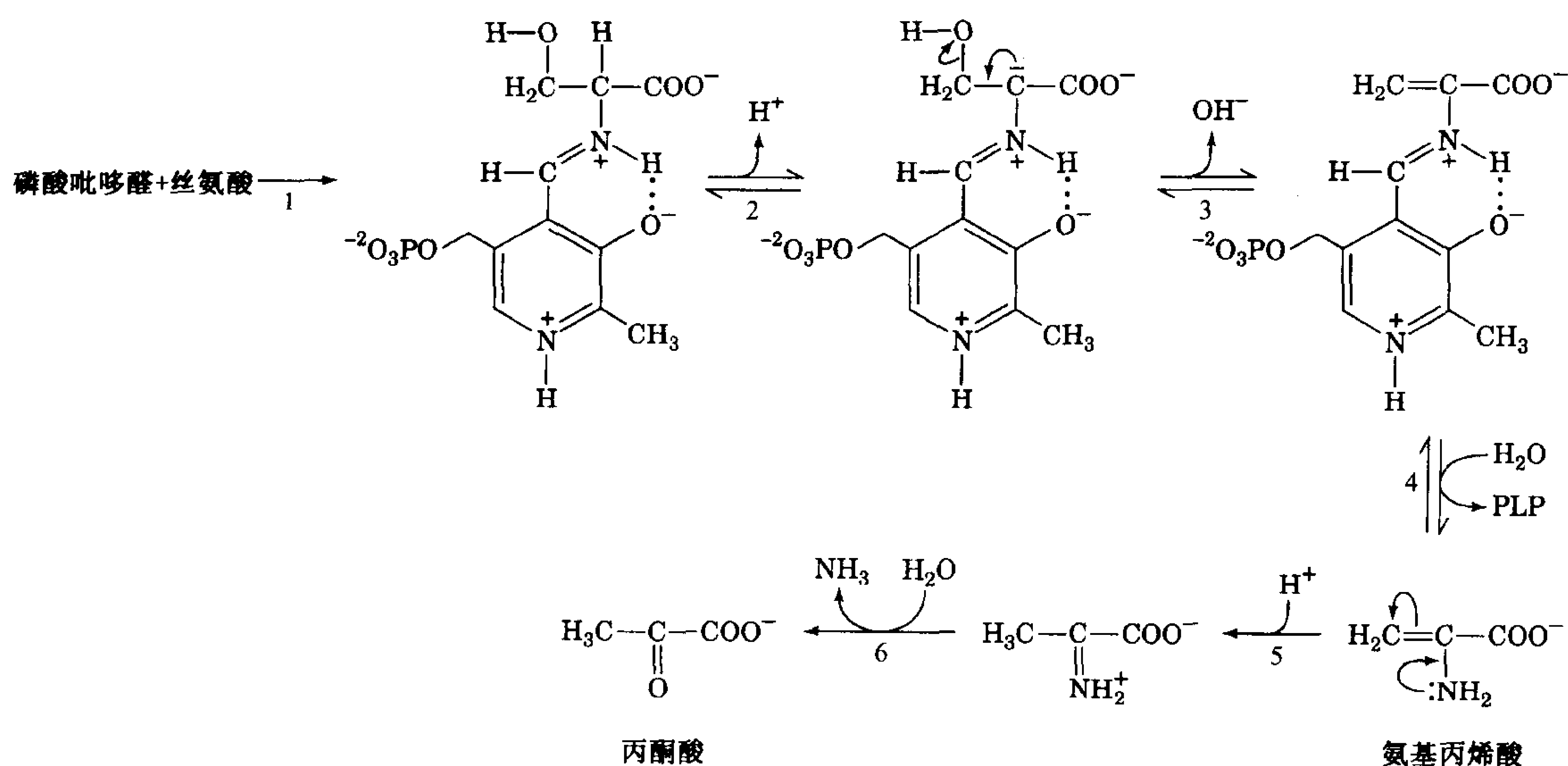


图 20-13 丝氨酸脱水酶反应

此依赖于 PLP 的酶催化丝氨酸中水的去除，反应包括 6 步：(1) 形成丝氨酸-PLP Schiff 碱。(2) 去除丝氨酸中的 α-氢原子，形成共振稳定的碳负离子。(3) β 位去除 OH^-。(4) 希夫碱水解产生 PLP-酶和氨基丙烯酸。(5) 非酶异构化为亚胺。(6) 非酶水解生成丙酮酸和氨。

半胱氨酸通过几种不同途径转化为丙酮酸，其巯基可以以 H_2S、SO_2^{3-} 或 SCN^- 的形式释放。

甘氨酸转化为丙酮酸时，首先由**丝氨酸羟甲基转移酶**(serine hydroxymethyl transferase)催化，转化为丝氨酸，该酶是又一个含 PLP 的酶(图 20-12，反应 4)，它以 **N^5，N^{10}-亚甲基-四氢叶酸**(N^5，N^{10}-methylene-tetrahydrofolate，N^5，N^{10}-methylene-THF)作为一碳供体(THF 辅助因子的结构和化学性质在节 20-4D 中介绍)。THF 辅助因子的亚甲基是从图 20-12 反应 3 中的第二个甘氨酸获得的，这一步反应是由**甘氨酸裂解系统**(glycine cleavage system)催化的。该酶是一个类似于丙酮酸脱氢酶(见节 16-2)的多蛋白复合物。甘氨酸裂解系统是介导哺乳动物组织中甘氨酸降解的主要途径。该系统的遗传性缺陷会导致**非酮体性高甘氨酸血症**(nonketotic hyperglycinemia)，其特征是智力障碍和大量甘氨酸在体液中累积。

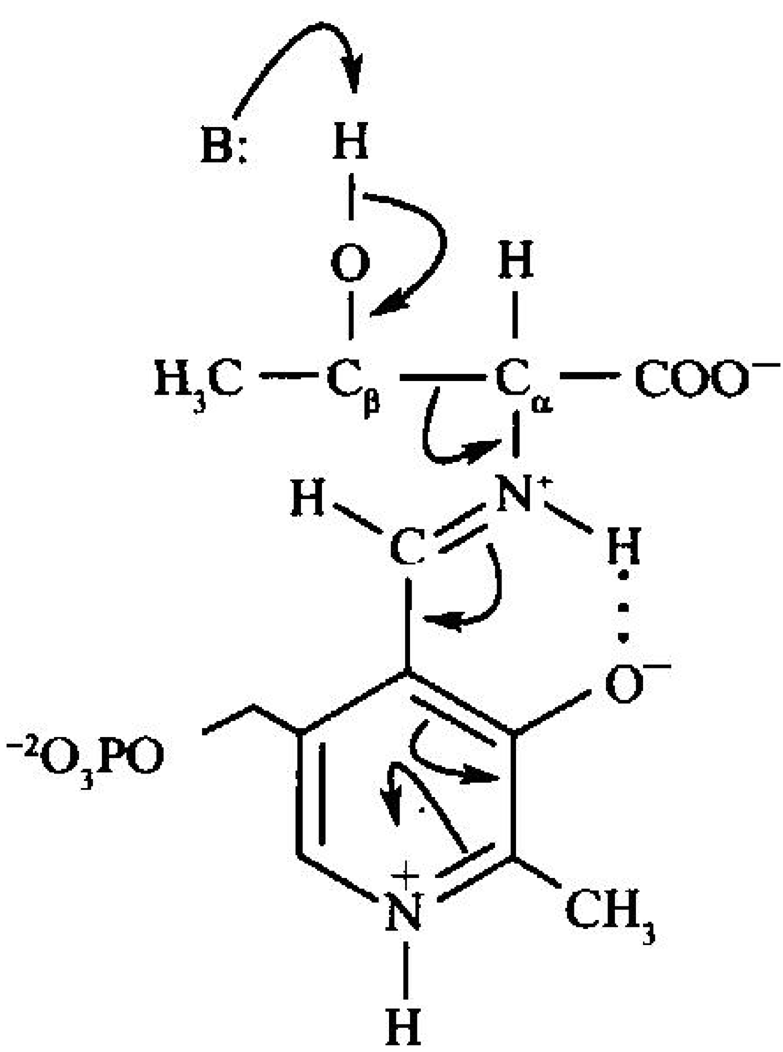
苏氨酸既生糖也生酮，因为它既可以产生丙酮酸也可以产生乙酰 CoA。它的主要降解途径由**苏氨酸脱氢酶**(threonine dehydrogenase)催化(图 20-12，反应 6)，产生 **α-氨基-β-酮丁酸**(α-amino-β-ketobutyrate)，再由 **α-氨基-β-酮丁酸裂解酶**(α-amino-β-ketobutyrate lyase)催化(图 20-12，反应 7)，转化为乙酰-CoA 和甘氨酸。甘氨酸可经由丝氨酸，再转化为丙酮酸。

627

丝氨酸羟甲基转移酶催化依赖于 PLP 的 $C_\alpha-C_\beta$ 键的生成和断裂

苏氨酸也可通过图 20-12 中的反应 5，切断苏氨酸的 C_α—C_β 键，直接转化为甘氨酸和乙醛(乙醛再被氧化为乙酰 CoA)。这个依赖于 PLP 的反应由丝氨酸羟甲基转移酶催化，同一个酶也可以催化在甘氨酸上加上一个羟甲基而生成丝氨酸(图 20-12，反应 4)。在甘氨酸→丝氨酸反应中，甘氨酸的 C_α—H 键断裂(如同在转氨作用中发生的那样，图 20-7)并生成 C_α—C_β 键。相反，

从苏氨酸降解为甘氨酸时，丝氨酸羟甲基转移酶逆向作用，先切断 $C_\alpha—C_\beta$ 键。



伴随切断任何一个与 C_α 的连接键，PLP 基团都可使电子从产生的碳负离子上离去。PLP 作用的这个特点是理解同一个氨基酸-PLP Schiff 碱如何在不同的酶作用下切断与 C_α 的不同连接键(图 20-7 中右上部的键 a、b 或 c)的关键。被切断的是和 PLP π 轨道系统垂直的平面内的键(图 20-14)。这种排列使 PLP π 轨道系统可以和包含被离去电子对的成键轨道重叠。任何其他几何结构都会使新形成的双键扭转到平面之外，成为高能排布。与 C_α 连接的不同连接键可以沿 $C_\alpha—N$ 键旋转而被定位到断裂的位置。显然，每种酶以适当的几何构型与氨基酸-PLP Schiff 碱结合，以便于键的断裂。

628

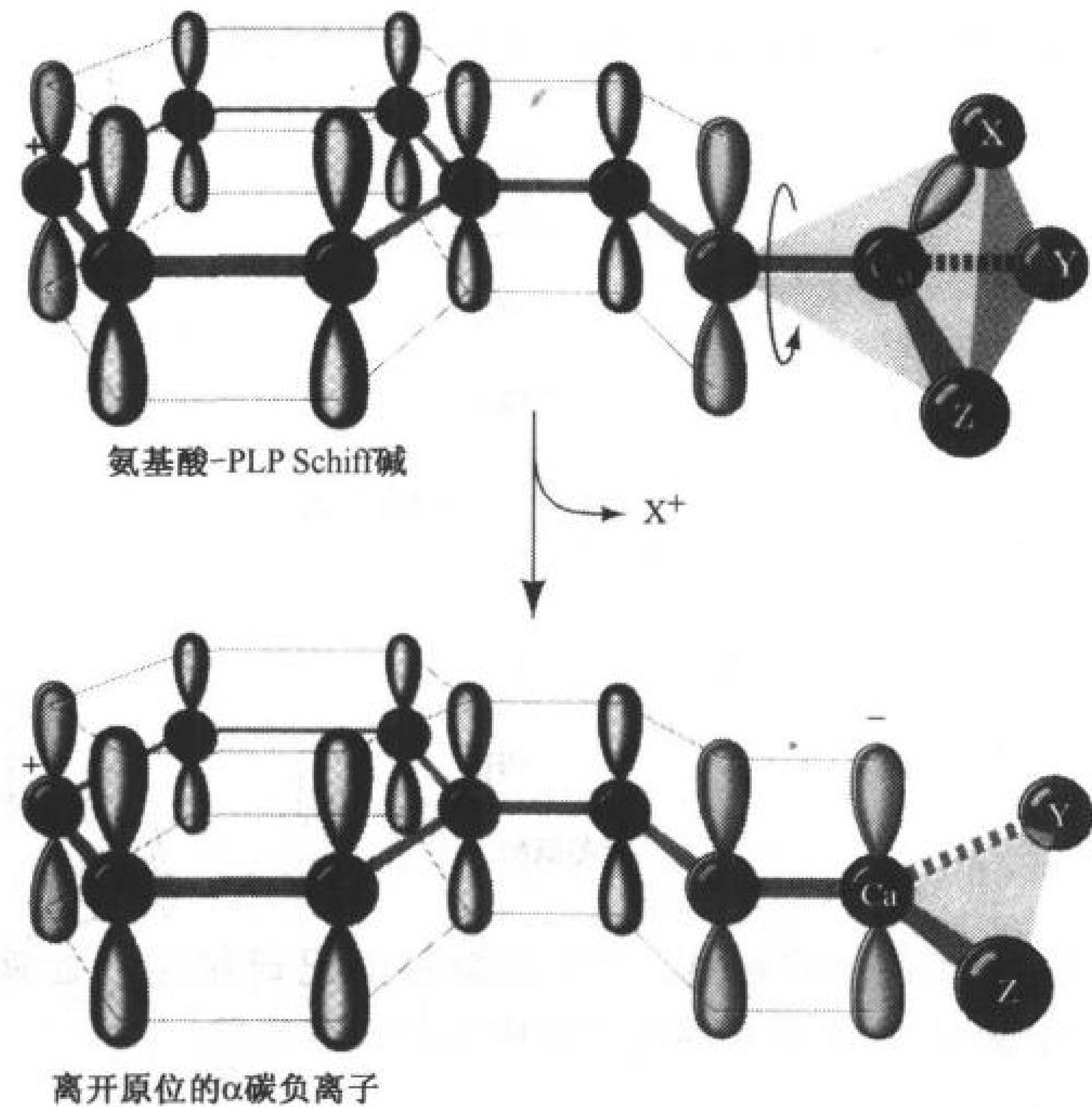
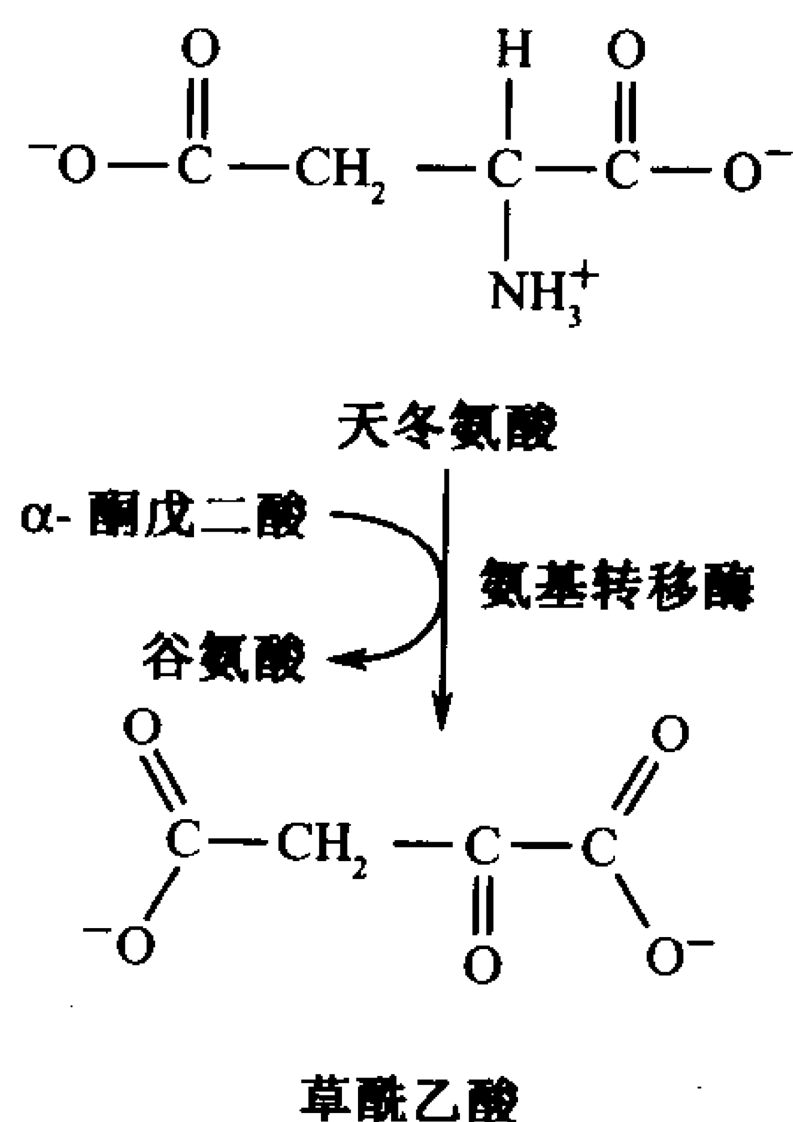


图 20-14　PLP-氨基酸希夫碱的 π 轨道框架

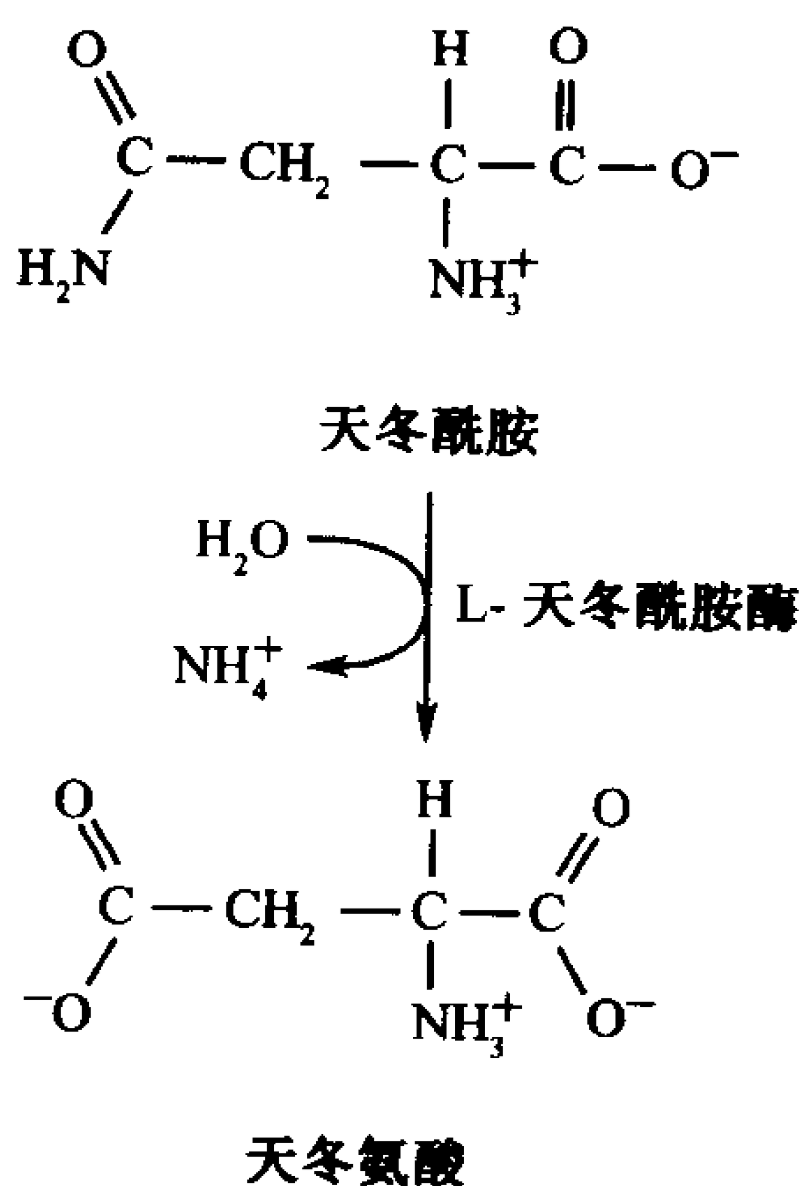
从 X 到 C_α 的连接键是在垂直于 PLP π 轨道系统(上部)平面的一个平面内，因此是不稳定的。被切断的键的电子对(底部)从共轭分子中离去。

B. 天冬酰胺和天冬氨酸被降解为草酰乙酸

天冬氨酸转氨直接生成草酰乙酸：



天冬酰胺被 **L-天冬酰胺酶**(L-asparaginase)水解为天冬氨酸后也可以以这种方式转化为草酰乙酸：



有意思的是，L-天冬酰胺酶是治疗癌症，尤其是**急性淋巴母细胞白血病**(acute lymphoblastic leukemia)的有效的化疗试剂，这些癌必须从血液中获得天冬酰胺。

C. 精氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸和脯氨酸被降解为 α-酮戊二酸

精氨酸、谷氨酰胺、组氨酸和脯氨酸都可以转化为谷氨酸(图 20-15)，再由谷氨酸脱氢酶氧化为 α-酮戊二酸(节 20-2B)。谷氨酰胺转化为谷氨酸只需一步反应：**谷氨酰胺酶**(glutaminase)催化的水解作用。组氨酸转化为谷氨酸的过程较为复杂：首先经非氧化脱氨，然后再水合，其咪唑环被断裂生成 ***N*-亚胺甲基谷氨酸**(*N*-formiminoglutamate)。然后亚胺甲基被转移到四氢叶酸中形成谷氨酸和 ***N*⁵-亚胺甲基-四氢叶酸**(N^5-formimino-tetrahydrofolate, 节 20-4D)。精氨酸和脯氨酸都通过形成中间产物**谷氨酸-5-半醛**(glutamate-5-semialdehyde)而转化为谷氨酸。

629

D. 异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸被降解为琥珀酰 CoA

异亮氨酸、甲硫氨酸和缬氨酸都有复杂的降解途径，都可以产生丙酰 CoA，后者也是奇数链脂肪酸降解的产物。丙酰 CoA 通过一系列需要生物素和辅酶 B_{12}的反应，转化为琥珀酰 CoA(见

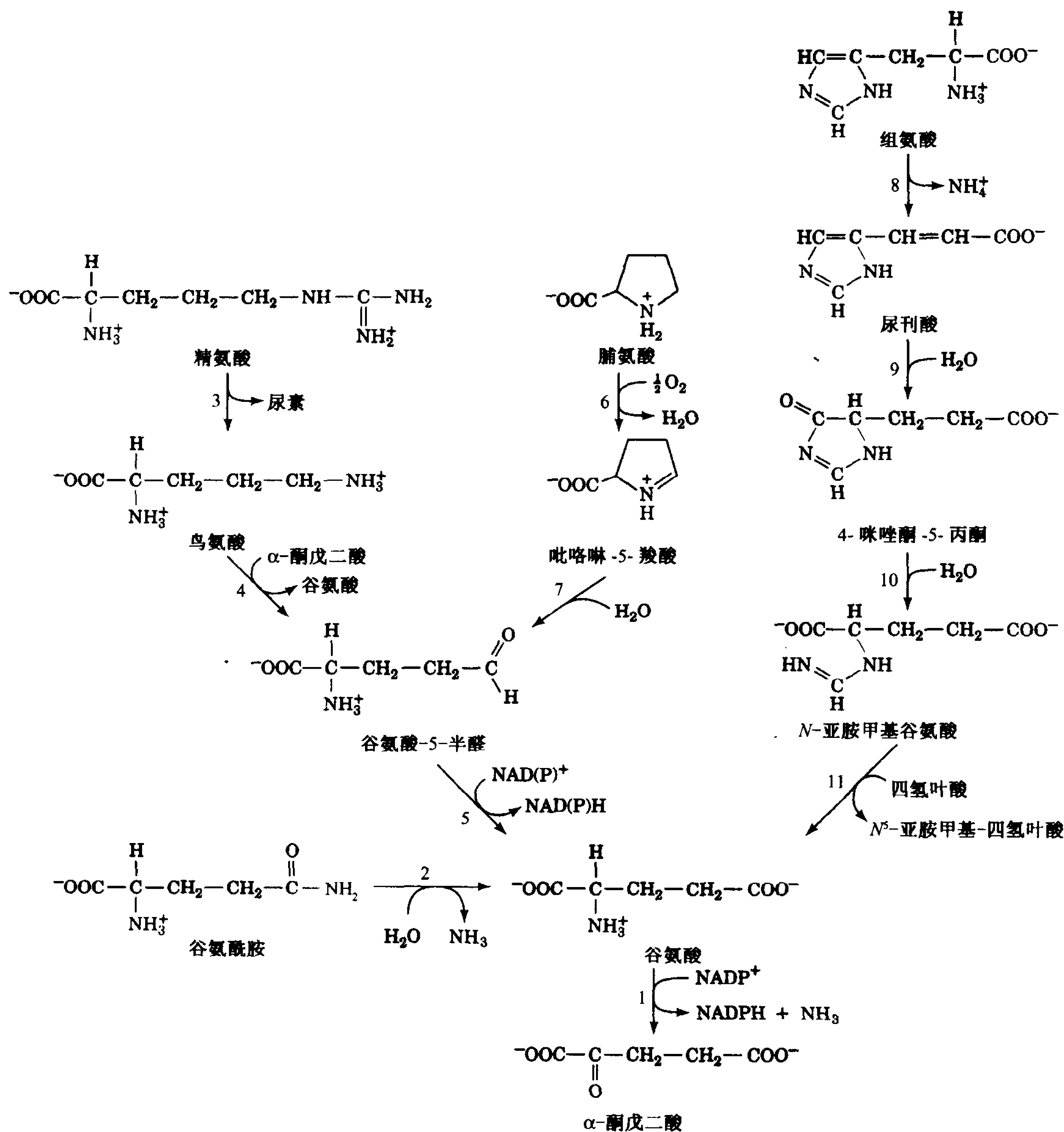


图 20-15 精氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸和脯氨酸降解为 α-酮戊二酸

催化反应的酶是(1) 谷氨酸脱氢酶。(2) 谷氨酰胺酶。(3) 精氨酸酶。(4) 鸟氨酸-δ-氨基转移酶。(5) 谷氨酸-5-半醛脱氢酶。(6) 脯氨酸氧化酶。(7) 自发进行。(8) 组氨酸氨裂解酶。(9) 尿刊酸水合酶。(10) 咪唑酮丙酸酶。(11)谷氨酸亚胺甲基转移酶。

节 19-2E)。

甲硫氨酸降解涉及 S-腺苷甲硫氨酸和半胱氨酸的合成

630

甲硫氨酸的降解(图 20-16),首先与 ATP 反应生成 ***S*-腺苷甲硫氨酸**(*S*-adenosylmethionine, SAM,或 AdoMet),这个硫离子的高反应性甲基使之成为一种重要的生物甲基化试剂。例如,从

磷脂酰乙醇胺(节 19-6A)合成磷脂酰胆碱时,SAM 作为甲基供体。

631

SAM 提供一个甲基之后,生成 **S-腺苷高半胱氨酸**(*S*-adenosylhomocysteine),后者再水解为腺苷酸和**高半胱氨酸**(homocysteine)。高半胱氨酸可以被甲基化而重新生成甲硫氨酸,在这个反应中,**N^5-甲基四氢叶酸**(N^5-methyltetrahydrofolate,见下)是甲基供体,或者高半胱氨酸与丝氨酸

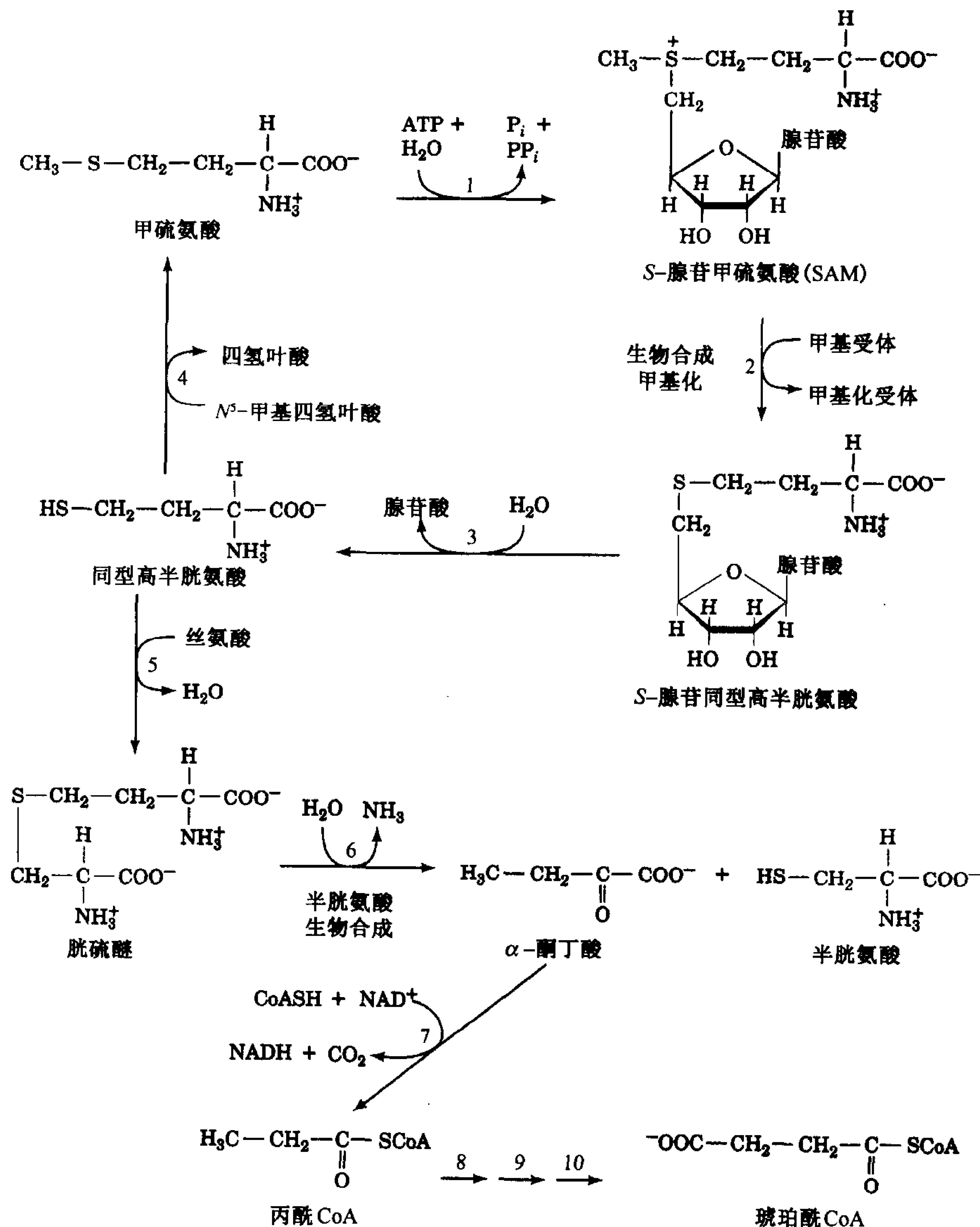


图 20-16 甲硫氨酸的降解

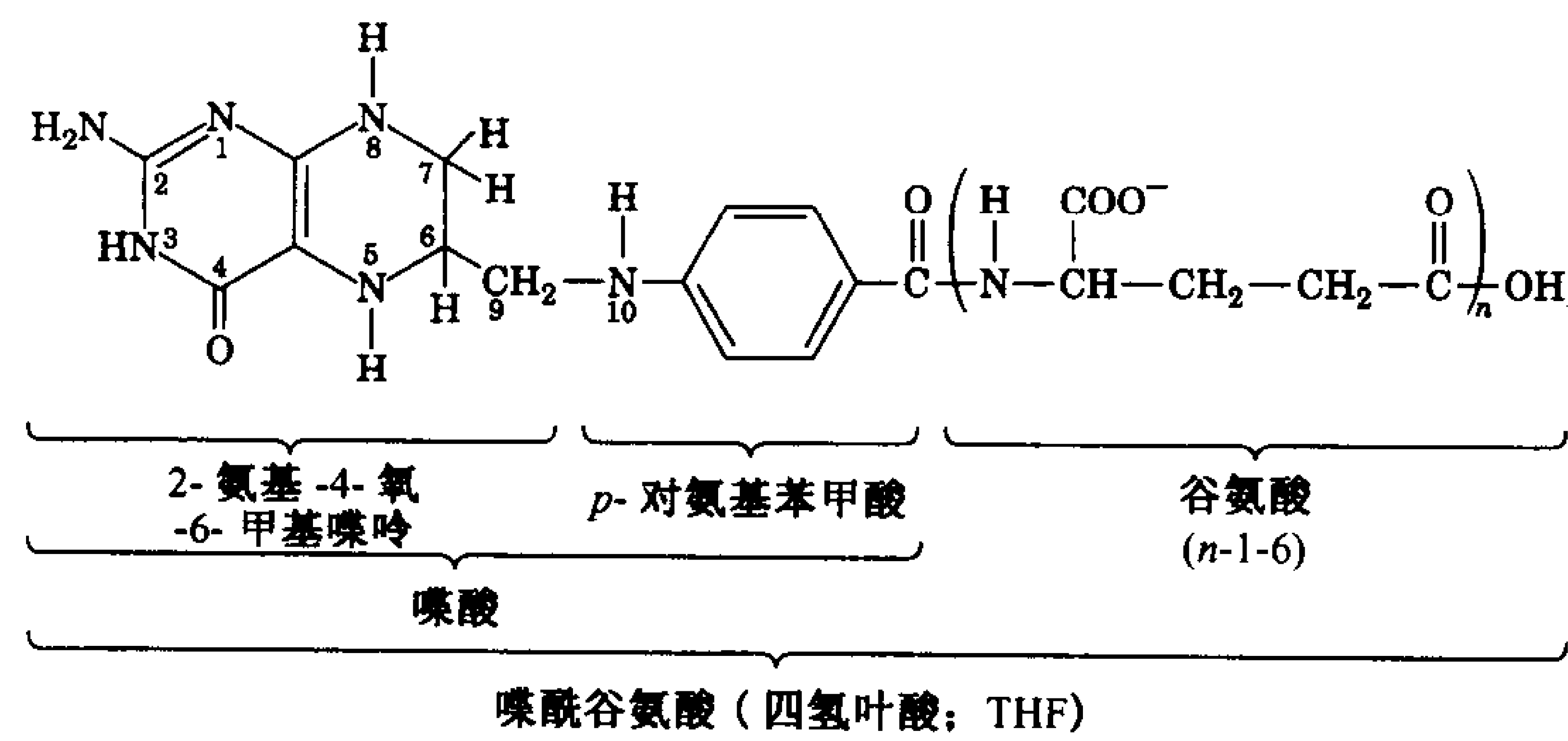
这条途径产生半胱氨酸和琥珀酰 CoA。涉及的酶是:(1)在产生生物甲基化试剂 S-腺苷甲硫氨酸(SAM)的反应中的甲硫氨酸腺苷转移酶。(2)甲基化酶。(3)腺苷同型高半胱氨酸酶。(4)甲硫氨酸合成酶(一种依赖于辅酶 B_{12}的酶)。(5)胱硫醚 β-合成酶(一种依赖于 PLP 的酶)。(6)胱硫醚 γ-裂解酶。(7)α-酮酸脱氢酶。(8)丙酰 CoA 羧化酶。(9)甲基丙二酸单酰 CoA 消旋酶。(10)甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶(一种依赖于辅酶 B_{12}的酶)。反应 8~10 在节 19-2E 中讨论。

结合生成**胱硫醚**(cystathionine),随后再生成半胱氨酸(半胱氨酸的生物合成)和 **α-酮丁酸**。α-酮丁酸继续降解生成丙酰 CoA,再转化为琥珀酰 CoA。

四氢叶酸是一碳单位载体

许多生物合成过程涉及到在代谢前体上添加 C_1单位。大多数羧化反应(如丙酮酸羧化酶;图 15-25)的酶需要生物素辅基。在有些反应中,*S*-腺苷甲硫氨酸(图 20-16)充当甲基化试剂。但是,四氢叶酸(THF)比上述这些辅助因子更为通用,因为它可以以几种氧化态转移 C_1 单位。

THF 是 6-甲基蝶呤依次与**对氨基苯甲酸**(p-aminobenzoic acid)和谷氨酸残基相连形成的衍生物。



多达 5 个额外的谷氨酸残基可通过异肽键连接到第一个谷氨酸上形成多谷氨酰尾巴。THF 由维生素**叶酸**(folic acid,拉丁文:folium,叶子的意思)衍生而来。THF 的双氧化形式必须被酶促还原,然后才能成为活性辅酶(图 20-17)。两步还原都是由**二氢叶酸还原酶**(dihydrofolate reductase,**DHFR**)催化的。哺乳动物不能合成叶酸,必须从食物中获取或者由肠道微生物提供。

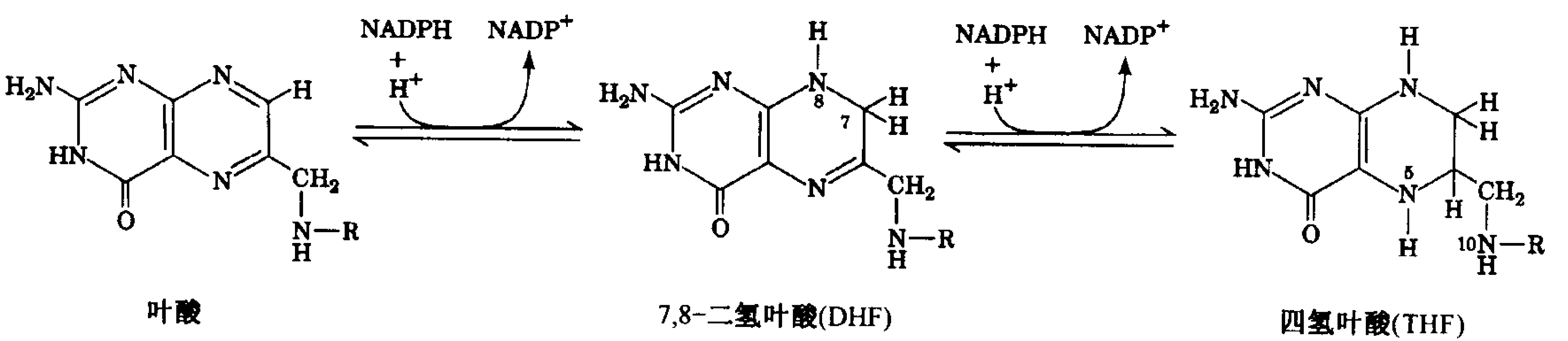


图 20-17　叶酸生成 THF 的二步还原
这二步反应都是由二氢叶酸还原酶催化的。

表 20-2　THF 携带的 C_1 基团的氧化级位

氧化级位	携带的基团	THF 衍生物
甲醇	甲基($-CH_3$)	N^5-甲基-THF
甲醛	亚甲基($-CH_2-$)	N^5, N^{10}-亚甲基-THF
甲酸	甲酰基($-CH=O$)	N^5-甲酰-THF, N^{10}-甲酰-THF
	亚胺甲基($-CH=NH$)	N^5-亚胺甲基-THF
	甲烯基($-CH=$)	N^5, N^{10}-甲烯基-THF

632

C_1 单位被共价连接到 THF 的 N_5、N_{10}位或同时连到 N_5 和 N_{10}位上。这些 C_1 单位,可能是甲酸、甲醛或甲醇的氧化级位(表 20-2),并且都可通过酶促氧化还原反应而相互转换(图 20-18)。

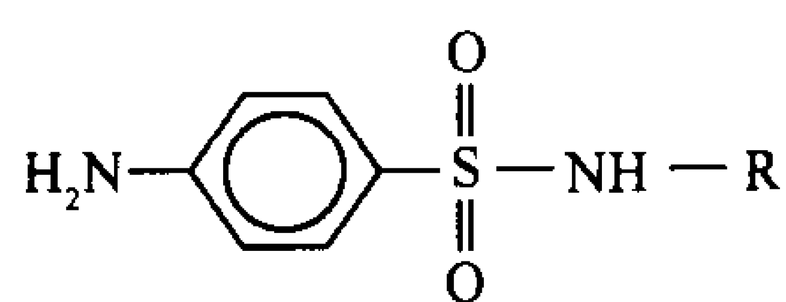
图 20-18 THF 携带的 C_1 单位的相互转化

THF 可以在丝氨酸转化为甘氨酸的反应(图 20-12 中反应 4 的逆反应,丝氨酸羟甲基转移酶催化)中、在甘氨酸的裂解反应中(图 20-12,反应 3)和组氨酸降解反应(图 20-15,反应 11)中获得 C_1 单位。THF 携带的 C_1 单位可用于从同型半胱氨酸合成甲硫氨酸(图 20-16)以及胸腺嘧啶核苷酸的合成(见节 22-3B)。

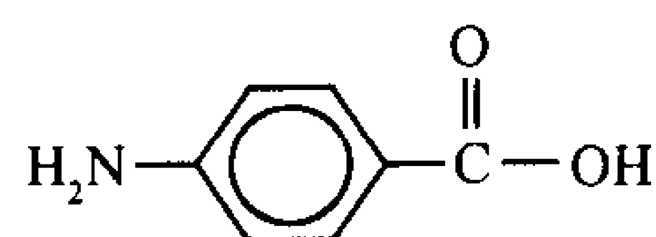
633

氨磺酰(sulfonamides,**磺胺药** sulfa drugs)如**对氨基苯磺酰胺**(sulfanilamide)是一类抗生素,是 THF 组分中对氨基苯甲酸的结构类似物。它们可以在对氨基苯甲酸掺入 THF 这一步竞争性

抑制细菌中 THF 的合成，从而阻断需要 THF 的反应。哺乳动物不能合成叶酸，因此不受氨磺酰的影响，这说明了这些已被广泛使用的抗菌剂如何可以应用于医学中。



氨磺酰
(R=H, 对氨基苯磺酰胺)



对氨基苯甲酸

支链氨基酸的降解涉及脂酰 CoA 的氧化作用

支链氨基酸如异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸降解开始的三步是由共同的酶催化的(图 20-19)：

$R_1R_2CH-CH(NH_3^+)-COO^-$

(A) 异亮氨酸：$R_1 = CH_3—$，$R_2 = CH_3—CH_2—$

(B) 缬氨酸：$R_1 = CH_3—$，$R_2 = CH_3—$

(C) 亮氨酸：$R_1 = H—$，$R_2 = (CH_3)_2CH—$

1：α-酮戊二酸 → 谷氨酸

$R_1R_2CH-C(=O)-COO^-$

(A) α-酮-β-甲基戊酸

(B) α-酮异戊酸

(C) α-酮已酸

2：$NAD^+ + CoASH$ → $NADH + CO_2$

$R_1R_2CH-C(=O)-SCoA$

(A) α-甲基丁酰CoA

(B) 异丁酰CoA

(C) 异戊酰CoA

3：FAD → $FADH_2$

(A) $CH_3—CH=C(CH_3)—C(=O)—SCoA$　甲基巴豆酰CoA → 3个反应 → (CoASH；$CH_3—C(=O)—SCoA$ 乙酰CoA) → $CH_3—CH_2—C(=O)—SCoA$ 丙酰CoA → → → 琥珀酰CoA

(B) $CH_2=C(CH_3)—C(=O)—SCoA$　甲基丙烯酰CoA → 4个反应 → (CO_2) → 丙酰CoA

(C) $(H_3C)_2C=CH—C(=O)—SCoA$　β-甲基巴豆酰CoA → 3个反应 → ($CH_3—C(=O)—SCoA$ 乙酰CoA) → $^-OOC—CH_2—C(=O)—CH_3$ 乙酰乙酸

图 20-19　支链氨基酸的降解

异亮氨酸(A)、缬氨酸(B)和亮氨酸(C)沿通用的起始途径降解，该途径需要 3 种酶：(1)支链氨基酸氨基转移酶。(2)支链 α-酮酸脱氢酶(BCKDH)。(3)脂酰 CoA 脱氢酶。然后异亮氨酸继续降解(左)产生乙酰 CoA 和琥珀酰 CoA；缬氨酸继续降解(中)产生琥珀酰 CoA；亮氨酸继续降解(右)产生乙酰 CoA 和乙酰乙酸。

1）转氨生成相应的 α-酮酸；

2）氧化脱羧生成相应的脂酰 CoA；

3）由 FAD 脱氢形成双键。

异亮氨酸降解途径中其余的反应与脂肪酸氧化（节 19-2C）类同，产生乙酰 CoA 和丙酰 CoA，后者再经三步反应转化为琥珀酰 CoA。缬氨酸比异亮氨酸少一个碳原子，降解时产生 CO_2 和丙酰 CoA，后者再转化为琥珀酰 CoA。亮氨酸的进一步降解产生乙酰乙酸而不是丙酰 CoA，将在节 20-4E 中讨论。

支链 α-酮酸脱氢酶（branched-chain α-keto acid dehydrogenase，BCKDH）催化图 20-19 中的反应 2，这是一个多酶复合物，与丙酮酸脱氢酶和 α-酮戊二酸脱氢酶复合物（见节 16-2 和节 16-3D）十分相似。实际上，这 3 种多酶复合物具有一个相同的亚基：E_3（二氢硫辛酰胺脱氢酶），并且除了它们的最终氧化剂为 NAD^+ 外，还都需要辅酶 TPP、硫辛酰胺和 FAD。

BCKDH 的基因缺陷会导致**槭糖浆尿病**（maple syrup urine disease），所以这样命名是因为 BCKDH 缺陷而导致的支链 α-酮酸的累积，使尿液具有槭树糖浆的特殊气味。除非立即通过低支链氨基酸饮食来治疗，否则槭糖浆尿症将很快致死。

634

E. 亮氨酸和赖氨酸降解产生乙酰乙酸和（或）乙酰 CoA

亮氨酸的降解，其起始和异亮氨酸、缬氨酸的降解方式相同（图 20-19），但是脱氧产生的 CoA 加合物，β-甲基巴豆酰 CoA，被转化为乙酰 CoA 和乙酰乙酸，后者是一种酮体。

在哺乳动物肝脏中，赖氨酸降解的主要途径是形成 α-酮戊二酸-赖氨酸的加合物，**酵母氨酸**（saccharopine）（图 20-20）。这个途径值得仔细研究，因为我们已在其他途径中遇到其 11 个反应中的 7 个反应。反应 4 是依赖于 PLP 的转氨反应，反应 5 是 α-酮酸的氧化脱羧，由类似于丙酮酸脱氢酶（见节 16-2）的多酶复合物催化。反应 6、8 和 9 是脂酰-CoA 氧化的标准反应：被 FAD 脱氢，水化以及被 NAD^+ 脱氢。反应 10 和 11 是酮体生成中的标准反应。在途径的反应 5 和 7 中产生了 2mol CO_2。

635

636

酵母氨酸途径被认为在哺乳动物中占优势，因为催化其中反应 1 的酶有基因缺陷会导致**高赖氨酸血症**（hyperlysinemia）和**高赖氨酸尿症**（hyperlysinuria）（即分别在血液和尿中赖氨酸浓度增高），同时出现智力和体力上的迟钝。这是又一个说明为什么研究罕见的遗传性疾病有助于了解代谢途径的例子。

F. 色氨酸被降解为丙氨酸和乙酰乙酸

色氨酸的主要降解途径十分复杂（见图 20-21），我们不能详细讨论其所有的反应。但是，有一个反应特别有意思：第 4 个反应是由**犬尿氨酸酶**（kynureininase）催化的，其 PLP 基团帮助断裂 $C_\beta—C_\gamma$ 键，释放出丙氨酸。该酶催化的反应其起始步骤与转氨作用（图 20-7）相同，然后由酶的一个亲核基团进攻共振稳定的中间产物的 C_γ，导致 $C_\beta—C_\gamma$ 键的断裂。色氨酸余下的碳骨架通过 5 步反应被转化为 α-酮己二酸，它也是赖氨酸降解中的中间产物。如图 20-20 所示，α-酮己二酸经 7 步反应被降解为乙酰 CoA 和乙酰乙酸。

637

G. 苯丙氨酸和酪氨酸被降解为延胡索酸和乙酰乙酸

由于苯丙氨酸降解的第一个反应是羟化生成酪氨酸，因此这两种氨基酸的降解由同一条途

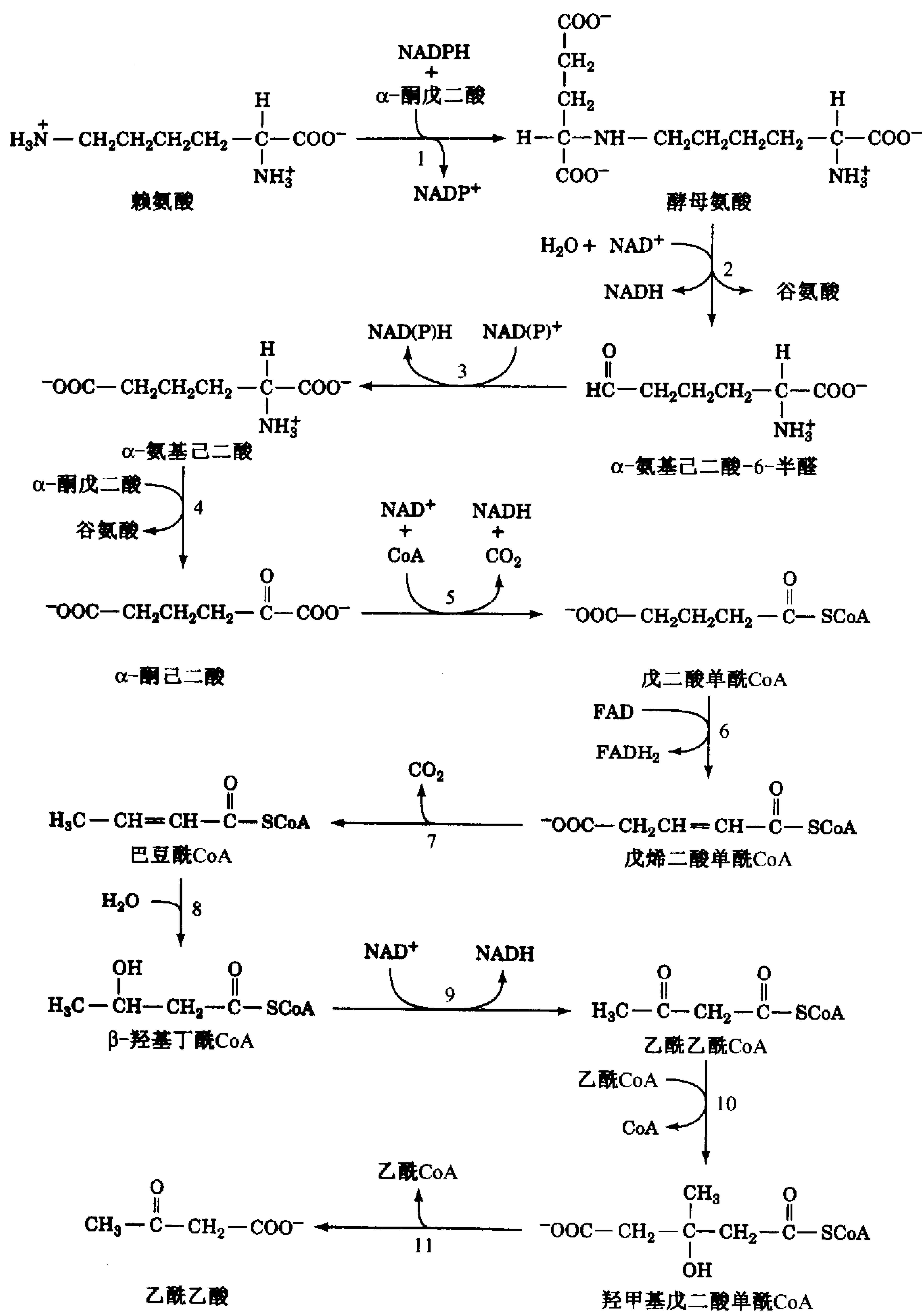


图 20-20　哺乳动物肝脏中赖氨酸的降解途径

涉及的酶是(1)酵母氨酸脱氢酶($NADP^+$,赖氨酸型)。(2)酵母氨酸脱氢酶(NAD^+,谷氨酸型)。(3)氨基己二酸-半醛脱氢酶。(4)氨基己二酸氨基转移酶(依赖于 PLP 的酶)。(5)α-酮酸脱氢酶。(6)戊二酸单酰-CoA 脱氢酶。(7)脱羧酶。(8)烯脂酰-CoA 水合酶。(9)β-羟基脂酰 CoA 脱氢酶。(10)HMG-CoA 合成酶。(11)HMG-CoA 裂解酶。反应 10 和 11 在节 19-3 中讨论。

径完成(图 20-22)。经过 6 步反应降解的终产物是延胡索酸,即柠檬酸循环中的一个中间产物,以及乙酰乙酸。催化反应 1 和 4 的酶缺陷可导致疾病(见框 20-1)。

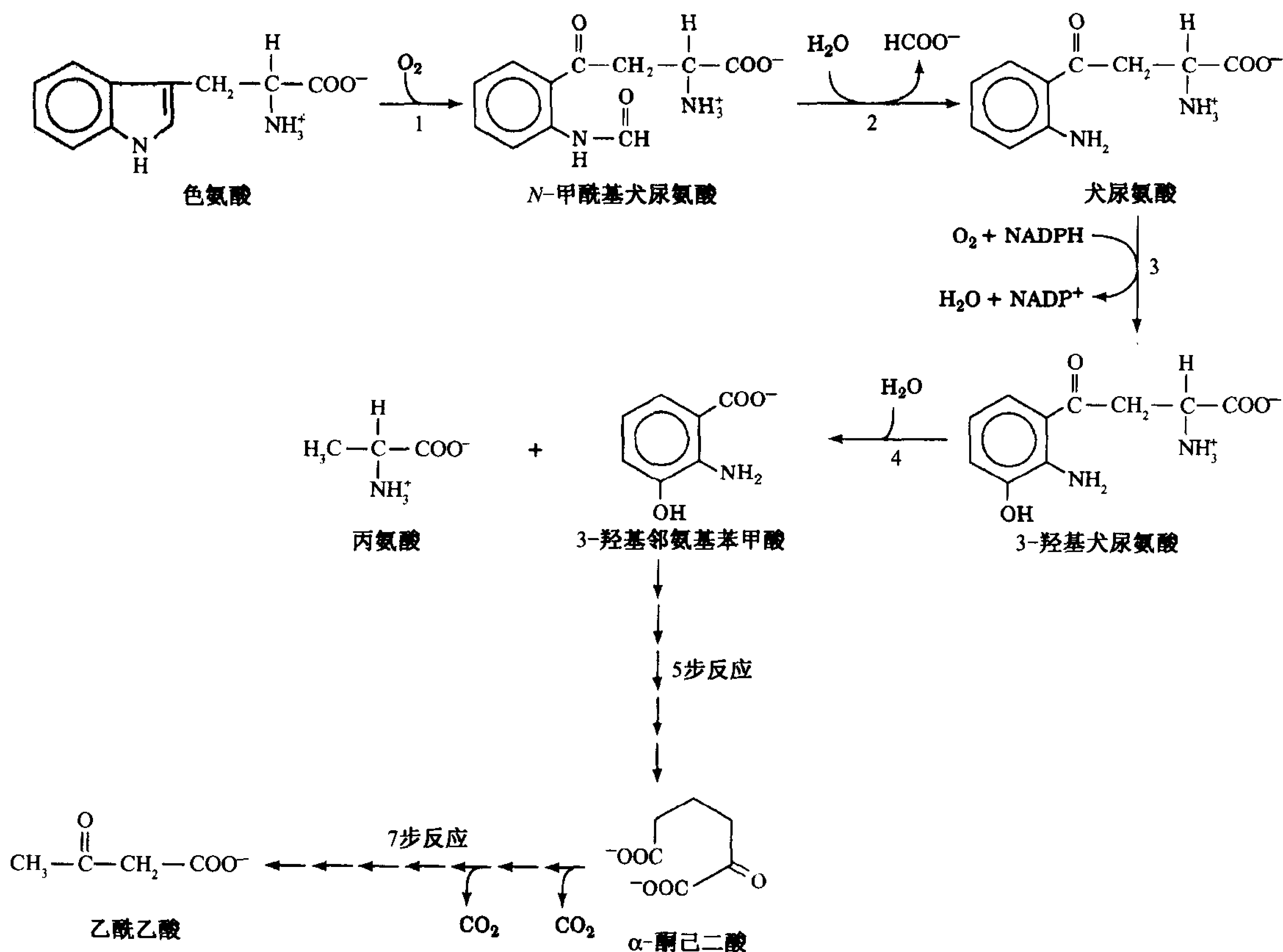


图 20-21　色氨酸降解途径

所示酶促反应由下列酶催化：(1) 色氨酸-2,3-二氧酶。(2) 甲酰胺酶。(3) 犬尿氨酸-3-单氧酶。(4) 犬尿氨酸酶(一个依赖于 PLP 的酶)。5 步反应将 3-羟基邻氨基苯甲酸转化为 α-酮己二酸，后者如图 15-20 中反应 5～11 所示，经 7 步反应转化为乙酰 CoA 和乙酸乙酸。

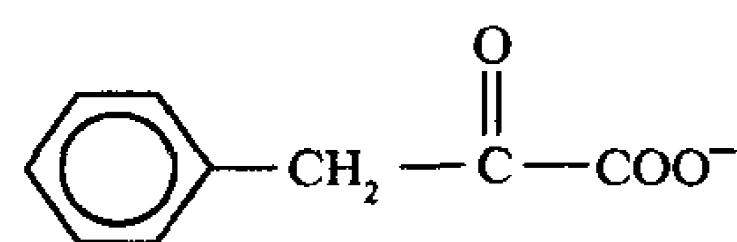
框 20-1　健康和疾病的生物化学

由于苯丙氨酸降解缺陷导致的苯丙酮尿症和尿黑酸尿症

Archibald Garrod 在 20 世纪早期就已认识到某些特定酶的缺陷会导致人类遗传性疾病，我们已多次提到这种认识对阐明代谢途径的贡献。Garrod 认识到的第一种这类疾病就是**尿黑酸尿症**(alcaptonuria)，即排出大量的**尿黑酸**(homogentisic acid)(见节 13-4B)。这是**尿黑酸二氧酶**(homogentisate dioxygenase)(图 20-22，反应 4)缺陷的结果。尿黑酸尿症患者除了晚年会有关节炎外，没有其他任何痛苦(虽然他们排出的尿黑酸由于被空气快速氧化，而使尿液呈惊人的深色)。

患有**苯丙酮尿症**(phenylketonuria, PKU)的病人就没有这样幸运了。如果未能检测出疾病并立即治疗，在病人出生后的几个月内就会出现严重的智力迟钝。PKU 是由于不能使苯丙氨酸羟化(图 20-22，反应 1)，因而导致血液中苯丙氨酸浓度的升高(**高苯丙氨酸血症**，hyperphenylalaninemia)引起的。过量的苯丙氨酸被转氨生成苯丙酮酸。正常情况下这一途径是次要的。苯丙酮酸(一种苯丙酮)“溢出”

到尿液中是最早观察到的与这种疾病有关的现象，并因此得名。现在所有美国出生的婴儿，在出生后立即检测血中苯丙氨酸的含量是否升高，以筛选 PKU。



苯丙酮酸

典型的 PKU 是由于苯丙氨酸羟化酶缺陷导致的。当 1947 年得出这一结论时，PKU 是第一个基本生物化学缺陷得到鉴定的先天性代谢异常。由于酪氨酸降解的所有的酶都是正常的，因此治疗措施包括给病人提供低苯丙氨酸食物，并跟踪血液中的苯丙氨酸水平，以保证在生命的前 5～10 年内该值维持在正常限度内（在这个年龄之后，高苯丙氨酸血症的有害性看起来就消失了）。**天冬苯丙二肽酯**（aspartame）（nutrasweet）是日常饮食中软饮料和其他许多食品中主要的甜味剂，其结构为天冬氨酰-苯丙氨酸-甲酯，是食物中苯丙氨酸的来源。因此对苯丙酮尿症病人的警告标签出现在所有这类产品上。

苯丙氨酸羟化酶的缺陷也是产生 PKU 另外一个共同症状的原因：病人的头发和皮肤颜色比他们的同胞浅。这是因为苯丙氨酸浓度升高，抑制了酪氨酸的羟化，即皮肤黑色素生成的第一个反应（图 20-37）。

自从引入婴儿筛选技术后，已经发现了高苯丙氨酸血症的其他类型。这些类型是由于催化苯丙氨酸羟化酶的辅助因子 5，6，7，8-四氢生物蝶呤生成或再生的酶有缺陷引起的（图 20-24）。

蝶呤是氧化还原辅助因子

638

由含 Fe(III)的酶——**苯丙氨酸羟化酶**（phenylalanine hydroxylase）催化的苯丙氨酸羟化反应（图 20-22，反应 1），需要辅助因子**生物蝶呤**（biopterin），它是一种**蝶呤**（pterin）衍生物。蝶呤是含**蝶啶**（pteridine）环的一类化合物（图 20-23）。注意蝶啶环和黄素辅酶（图 13-11）异咯嗪环之间的相似性：蝶啶氮原子的位置与异咯嗪 B 环和 C 环的氮原子位置相同。叶酸衍生物也含有蝶呤环（见节 20-4D）。

蝶呤和黄素一样参与生物氧化作用。生物蝶呤的活性形式是完全还原的形式，即 **5，6，7，8-四氢生物蝶呤**（5，6，7，8-tetrahydrobiopterin）。它是从 7，8-二氢生物蝶呤（7，8-dihydrobiopterin）和 NADH 生成的（图 20-24），这个反应可认为是一个启动反应，由二氢叶酸还原酶催化，该酶同时还可以将二氢叶酸还原为四氢叶酸（图 20-17）。在苯丙氨酸羟化酶催化的反应中，5，6，7，8-四氢生物蝶呤被氧化成 7，8-二氢生物蝶呤（醌式）。这种醌式随后被需要 NADH 的酶——**二氢蝶啶还原酶**（dihydropteridine reductase）还原，再生为活性辅助因子。虽然二氢叶酸还原酶和二氢蝶啶还原酶产物相同，但是作用于底物的不同异构体。

5. 氨基酸的生物合成

640

许多氨基酸的合成途径，只存在于植物和微生物中。由于哺乳动物必须从食物中获得这些氨基酸，因此被称为**必需氨基酸**（essential amino acid）。其他氨基酸，哺乳动物则可从共同的中间产物合成，这些氨基酸被称为**非必需氨基酸**（nonessential amino acid）。人的必需和非必需氨基酸见表 20-3。虽然尿素循环可以合成精氨酸（见节 20-3A），但是在儿童（不是成人）正常生长和发育期间所需要的精氨酸，比这一途径所能产生的精氨酸多得多，因此，精氨酸也归类为必需氨基酸。



图 20-22 苯丙氨酸的降解途径

涉及的酶是：(1) 苯丙氨酸羟化酶。(2) 氨基转移酶。(3) 对-羟基苯丙酮酸二氧酶。(4) 尿黑酸二氧酶。(5) 马来酰乙酰乙酸异构酶。(6) 延胡索酰乙酰乙酸酶。

图 20-23 生物蝶呤和叶酸的蝶啶环核

注意：蝶啶和黄素辅酶的异咯嗪环的结构相似。

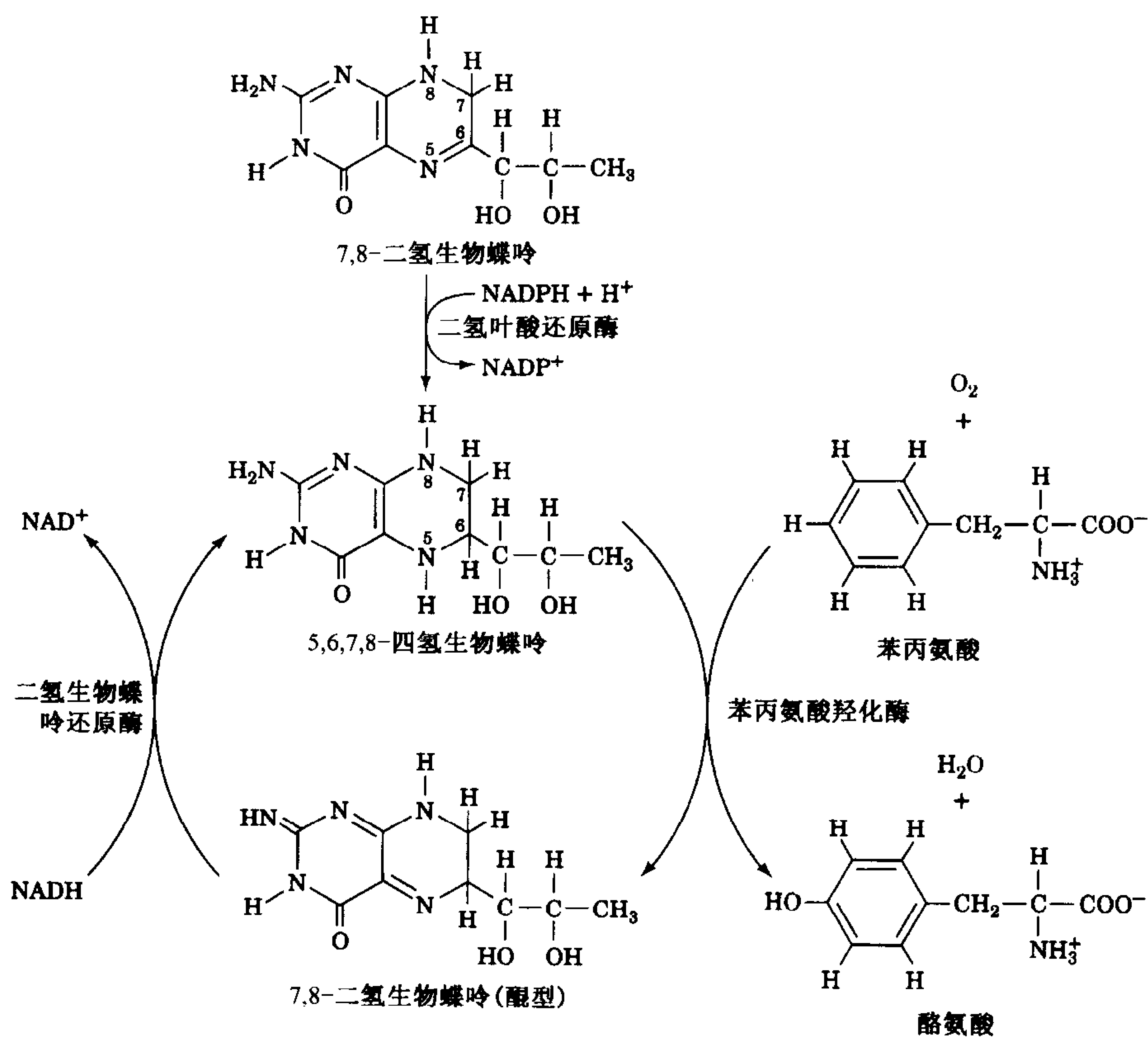


图 20-24 苯丙氨酸羟化酶反应中 5,6,7,8-四氢生物蝶呤的生成、利用和再生

表 20-3 人的必需和非必需氨基酸

必需	非必需
精氨酸[a]	丙氨酸
组氨酸	天冬酰胺
异亮氨酸	天冬氨酸
亮氨酸	半胱氨酸
赖氨酸	谷氨酸
甲硫氨酸	谷氨酰胺
苯丙氨酸	甘氨酸
苏氨酸	脯氨酸
色氨酸	丝氨酸
缬氨酸	酪氨酸

[a] 虽然哺乳动物可以合成精氨酸，但是其中的大部分被裂解形成尿素(见节 20-3A)。

在这一节，我们研究生成非必需氨基酸的途径。我们也将简要介绍必需氨基酸在植物和微生物体内的合成途径。始终要记住，*在不同的种属中这些合成途径差异很大，相反，糖和脂类化合物的基本代谢途径却都是通用的。*

A. 非必需氨基酸的生物合成

除了酪氨酸外,其他所有的非必需氨基酸都是从下列4种常见代谢中间产物:丙酮酸、草酰乙酸、α-酮戊二酸和甘油-3-磷酸酸中的一种开始,通过简单途径合成的。酪氨酸其实是错误地被归类为非必需氨基酸,因为它是通过必需氨基酸——苯丙氨酸的一步羟化反应合成的(图20-22)。实际上,对食物中苯丙氨酸的需求也反映了对酪氨酸的需求,因此食物中存在酪氨酸可以降低对苯丙氨酸的需要。

丙氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、谷氨酸和谷氨酰胺是从丙酮酸、草酰乙酸和α-酮戊二酸合成的

丙酮酸、草酰乙酸和α-酮戊二酸分别是对应于丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的α-酮酸(即所谓的碳骨架)。实际上,这些氨基酸的合成都是一步转氨反应(图20-25,反应1~3)。天冬酰胺和谷氨酰胺分别是从天冬氨酸和谷氨酸通过依赖于ATP的酰胺化反应合成。在**谷氨酰胺合成酶**(glutamine synthetase)催化的反应中(图20-25,反应5),谷氨酸首先与ATP反应形成**γ-谷氨酰磷酸**(γ-glutamylphosphate)中间产物而被活化。然后NH_3取代磷酸基生成谷氨酰胺。奇怪的

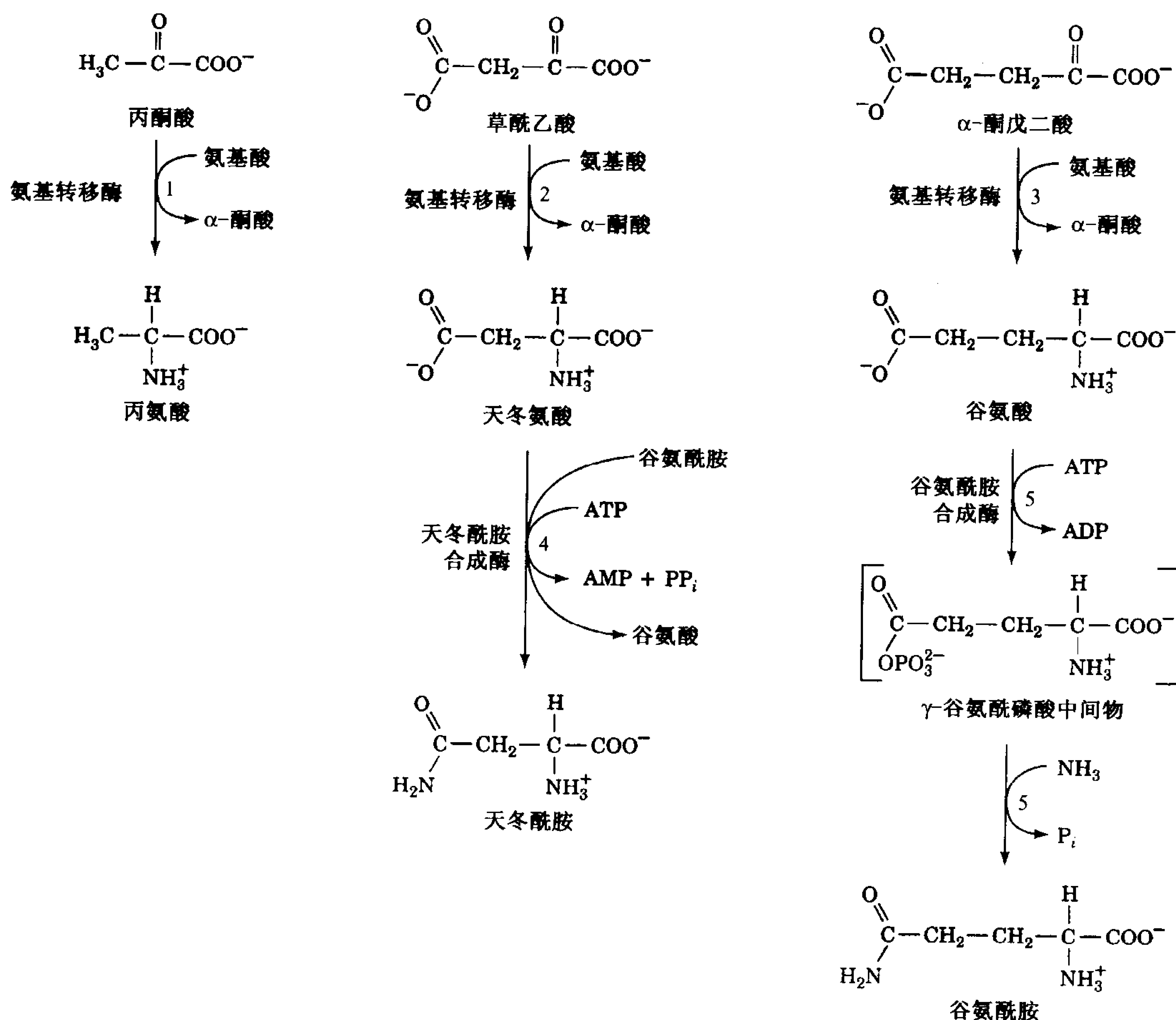


图20-25 丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺的合成

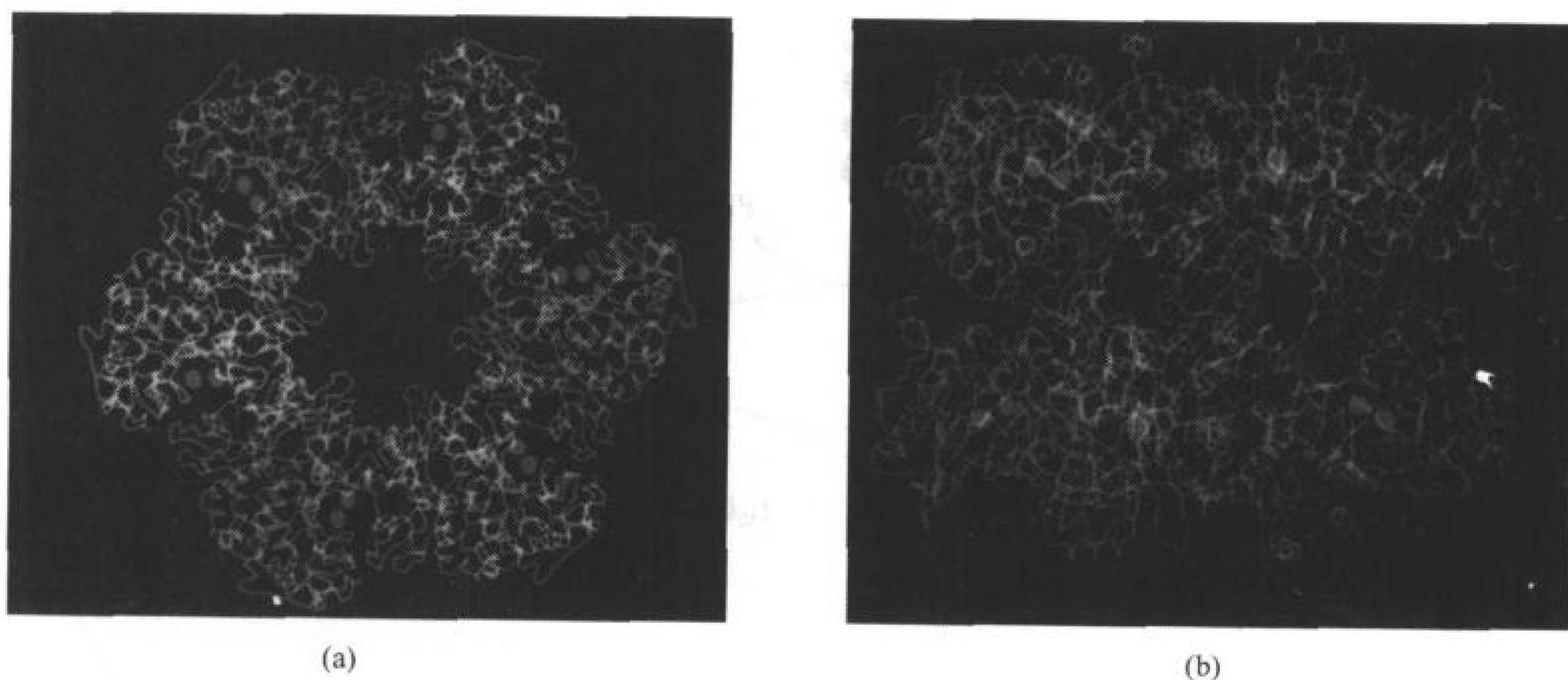
这些反应分别涉及(1)丙酮酸。(2)草酰乙酸。(3)α-酮戊二酸的转氨作用。(4)天冬氨酸。(5)谷氨酸的酰胺化。

是,**天冬酰胺合成酶**(asparagine synthetase)催化的天冬氨酸酰胺化生成天冬酰胺的途径与此不同;它利用谷氨酰胺作为氨基供体,并将 ATP 水解为 AMP + PP_i(图 20-25,反应 4)。

在氮代谢中谷氨酰胺合成酶是一个中心调控点

谷氨酰胺既是氨的贮存形式,也是许多生物合成的氨基供体。因此,谷氨酰胺合成酶的调控对调节氮代谢非常关键。哺乳动物谷氨酰胺合成酶可以被谷氨酸氧化脱氨(节 20-2B)的产物 α-酮戊二酸激活。这种调控可能防止了该反应产生的氨在体内累积。 641

Earl Stadtman 指出,细菌中的谷氨酰胺合成酶有更精细的调控体系。该酶由 12 个相同的亚基组成,每个亚基有 469 个残基,排列在一个六棱柱的角上(图 20-26),该酶既受共价修饰的调节,也受几种别构效应物的调节。此调控体系的几个方面值得注意,9 个*别构反馈抑制剂各有自己的结合位点,可以以累积的方式调控细菌谷氨酰胺合成酶的活性*。这些效应物中的 6 个——组氨酸、色氨酸、氨甲酰磷酸(由氨甲酰磷酸合成酶 II 合成)、葡萄糖胺-6-磷酸、AMP 和 CTP——都是从谷氨酰胺开始的合成途径的终产物,另外 3 个——丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸——反映细胞内的氮水平。



(a) (b)

图 20-26 沙门氏伤寒杆菌(*Salmonella typhimurium*)的谷氨酰胺合成酶的 X 射线结构
该酶由 12 个相同亚基组成,在图中以其 C_α 骨架表示,按 $\dot{D}_6$ 对称排列(六棱柱的对称方式)。(a)沿对称体的六重对称轴向下看,只能看到上层环的 6 个亚基,以交替的蓝色和绿色表示。下层环的亚基基本上直接位于上层环各亚基之下。该蛋白质,包括其侧链(未显示),直径为 143 Å。酶活性所需的 Mg^{2+} 离子对(红色球)显示在每一个活性中心中。每个腺苷酰化位点,Tyr397(红色),位于两个亚基之间。(b)沿二重对称轴的侧面观察,只能看到6个最近的亚基。该分子沿六重对称轴伸展 103 Å,对称轴垂直于侧面观。

大肠杆菌谷氨酰胺合成酶通过一个特定的 Tyr 残基的**腺苷酰化**(adenylylation,添加一个 AMP 基)而被共价修饰(图 20-27)。随着腺苷酰化程度的增加,酶对累积反馈抑制作用的敏感性增加,因此活性下降。腺苷酰化水平受控于一个复杂的代谢级联反应,概念上类似糖原磷酸化酶的调控(见节 15-3B)。谷氨酰胺合成酶的腺苷酰化和去腺苷酰化,都由**腺苷酰基转移酶**(adenylyltransferase)和一个四聚体调节蛋白——P_{II}形成的复合物催化。当 P_{II}被**尿苷酰化**(uridylylated)后(也在一个 Tyr 残基上),这个复合物催化谷氨酰胺合成酶去腺苷酰化,而当 P_{II}缺少 UMP 残基时,这个复合物就使谷氨酰胺合成酶腺苷酰化。反过来,P_{II}尿苷酰化的水平又取决于在同 642

一种蛋白质上的两种酶活性的相对活性：一个是使 P_{II}尿苷酰化的**尿苷酰基转移酶**(uridylyl-transferase)，一个是水解切去 P_{II}上相连的 UMP 基团的**尿苷酰基-移去酶**(uridylyl-removing enzyme)。尿苷酰基转移酶被 α-酮戊二酸和 ATP 激活，被谷氨酰胺和 P_i 抑制，而尿苷酰基移去酶则对这些代谢物不敏感。这种微妙的代谢级联调控使 *E.coli* 的谷氨酰胺合成酶活性对细胞内的氮需求极为敏感。

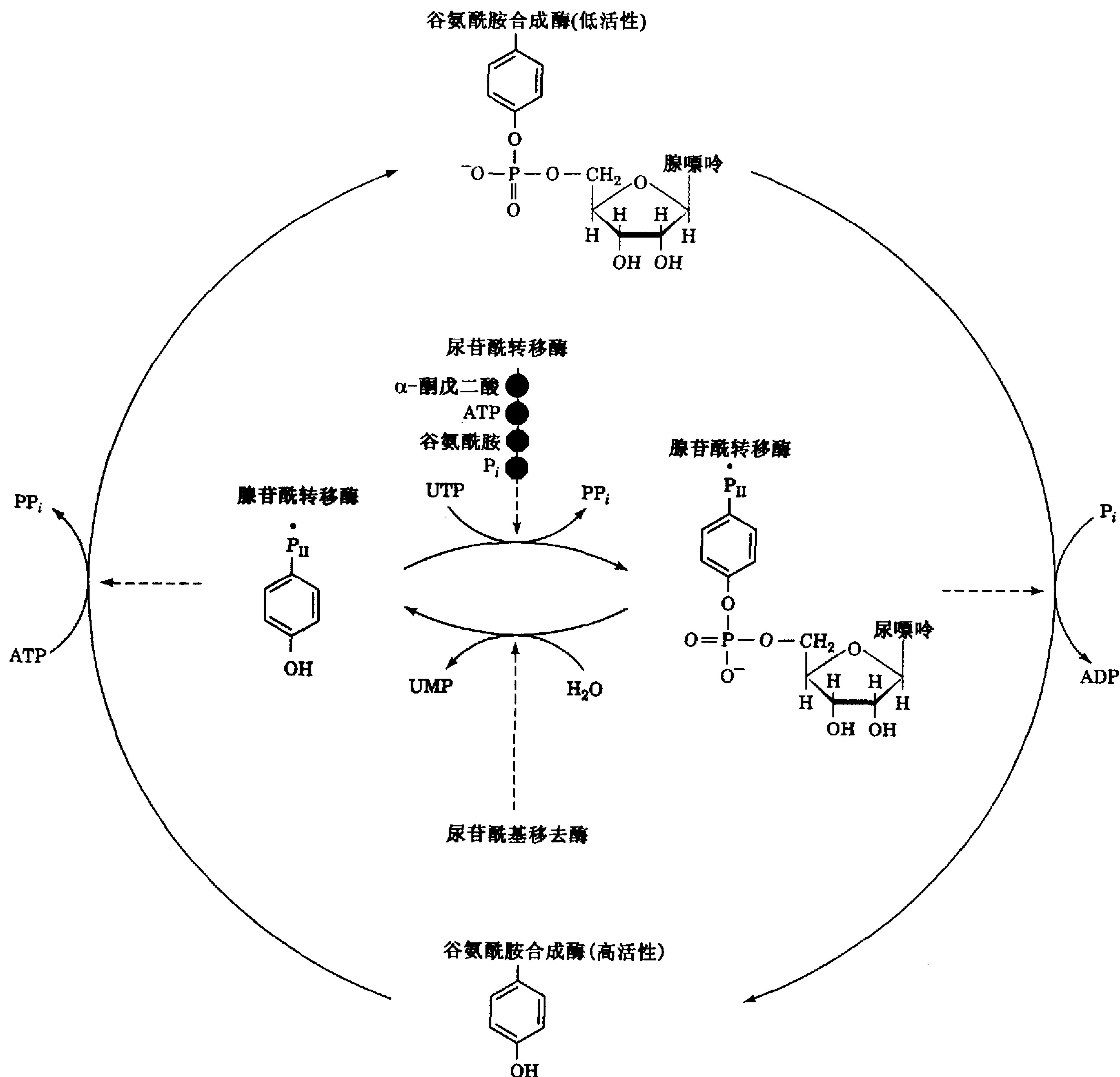


图 20-27 细菌谷氨酰胺合成酶的调控

特定的 Tyr 残基的腺苷酰化/去腺苷酰化受腺苷酰转移酶 P_{II}的特定 Tyr 残基尿苷酰化水平的调控。该尿苷酰化水平反过来又受尿苷酰转移酶和尿苷酰移去酶的相对活性的调控。尿苷酰转移酶对不同的氮代谢水平敏感，尿苷酰基移去酶的活性则不依赖于这些代谢物的水平。

谷氨酸是脯氨酸、鸟氨酸和精氨酸的前体

谷氨酸到脯氨酸的转化过程(图 20-28,反应 1～4)包括 γ-羧基被还原为醛基,接着形成一个分子内 Schiff 碱,后者进一步还原产生脯氨酸。谷氨酸的 γ-羧基被还原为醛基是一个需能过程,首先由 **γ-谷氨酰激酶**(γ-glutamyl kinase)催化羧基的磷酸化,这有助于 γ-羧基的还原。产生的不稳定产物,**谷氨酸-5-磷酸**(glutamate-5-phosphate),虽然尚未从反应混合物中分离得到,但被认为

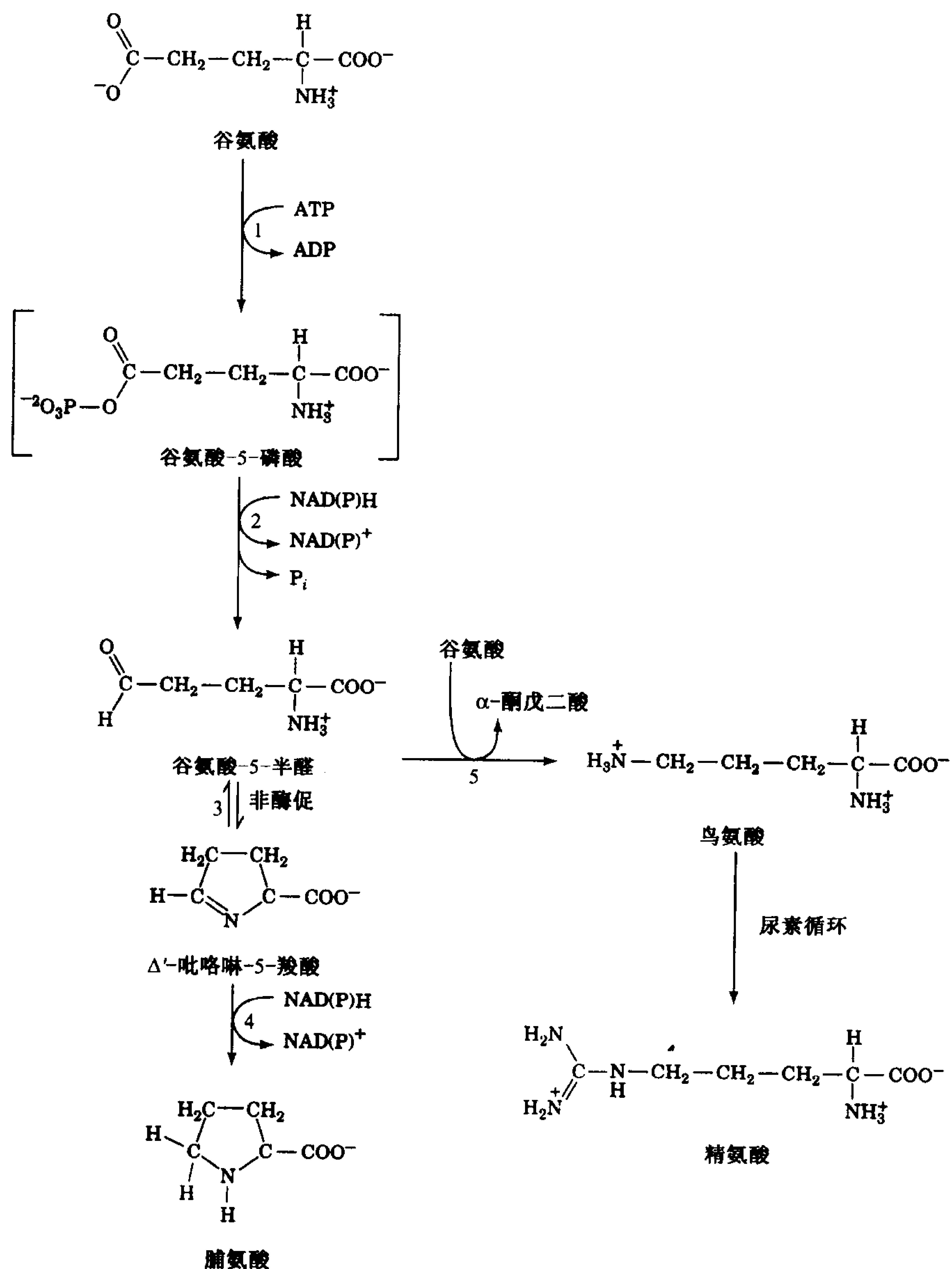


图 20-28　谷氨酸家族氨基酸:精氨酸、鸟氨酸和脯氨酸的生物合成

脯氨酸生物合成的催化剂是:(1)γ-谷氨酰激酶。(2)脱氢酶。(3)非酶促反应。(4)吡咯啉-5-羧酸还原酶。在哺乳动物中,鸟氨酸是由鸟氨酸-δ-氨基转移酶(5)作用,从谷氨酸-5-半醛产生的。鸟氨酸通过尿素循环(见节 20-3A)转化为精氨酸。

643 是后继反应的底物。产生的**谷氨酸-5-半醛**(glutamate-5-semialdehyde)(这也是精氨酸和脯氨酸降解的产物;图 20-15)自发环化生成分子内 Schiff 碱 **Δ^1-吡咯啉-5-羧酸**(Δ^1-pyrroline-5-carboxylate),最后由**吡咯啉-5-羧酸还原酶**(pyrroline-5-carboxylate reductase)催化还原为脯氨酸,该酶是否需要 NADH 或 NADPH 尚不清楚。

在人体内,谷氨酸是通过脯氨酸生物合成第二步反应后的一条分支途径合成鸟氨酸的,这一途径有三步反应(图 20-28)。和 Δ^1-吡咯啉-5-羧酸处于平衡的谷氨酸-5-半醛直接转氨产生鸟氨酸,反应由**鸟氨酸-δ-氨基转移酶**(ornithine-δ-aminotransferase)催化(图 20-28,反应 5)。鸟氨酸通过尿素循环中的反应转化为精氨酸(图 20-8)。

644

645

丝氨酸、半胱氨酸和甘氨酸从甘油-3-磷酸酸衍生而来

丝氨酸是从糖酵解中间产物 3-磷酸甘油酸衍生而来的,这一途径包括 3 步反应(图 20-29):

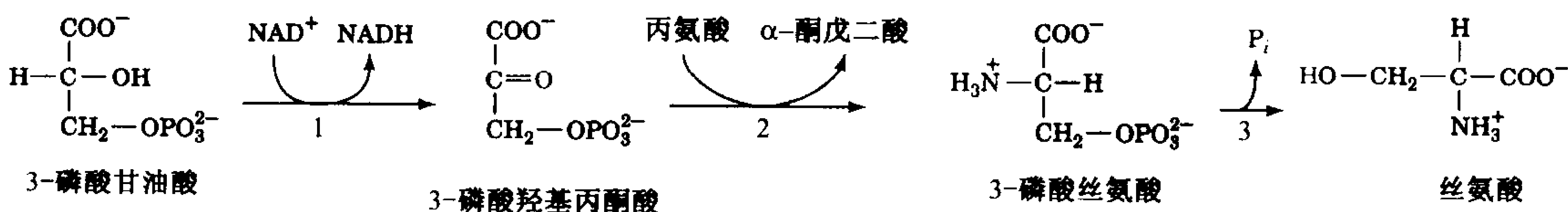


图 20-29 甘油-3-磷酸酸转化为丝氨酸

这一途径中的酶是:(1)甘油-3-磷酸酸脱氢酶。(2)依赖于 PLP 的氨基转移酶。(3)磷酸丝氨酸磷酸酶。

1) 甘油-3-磷酸酸的 2-OH 基转化为酮基,产生 3-磷酸羟基丙酮酸,这是丝氨酸的磷酸化酮酸类似物;

2) 3-磷酸羟基丙酮酸转氨生成磷酸丝氨酸;

3) 磷酸丝氨酸水解生成丝氨酸;

丝氨酸以两种方式参与甘氨酸的合成:

1) 由丝氨酸羟甲基转移酶催化丝氨酸直接转化为甘氨酸,这一反应也产生 N^5,N^{10}-亚甲基 THF(图 20-12,反应 4 的逆反应);

2) 甘氨酸合成酶催化 N^5,N^{10}-亚甲基 THF 与 CO_2 和 NH_4^+ 缩合(图 20-12,反应 3 的逆反应)。

在动物体内,半胱氨酸是从丝氨酸和高半胱氨酸合成的,后者是甲硫氨酸的降解产物(图 20-16,反应 5 和 6)。高半胱氨酸与丝氨酸结合产生胱硫醚,后者再形成半胱氨酸和 α-酮丁酸。由于半胱氨酸的巯基是从必需氨基酸甲硫氨酸衍生而来的,因此半胱氨酸可以视作一种必需氨基酸。

B. 必需氨基酸的生物合成

和非必需氨基酸一样,必需氨基酸也是从常见的代谢前体合成的。但是它的合成途径只存在于微生物和植物体内,通常涉及的步骤比非必需氨基酸多。合成必需氨基酸的酶显然在动物进化的早期被丢失了,可能是因为这些氨基酸在食物中很容易获得。我们将只着重讨论众多必需氨基酸生物合成反应中的几个。

天冬氨酸家族：赖氨酸、甲硫氨酸和苏氨酸

在细菌中，天冬氨酸是赖氨酸、甲硫氨酸和苏氨酸的共同前体(图 20-30)。这些必需氨基酸的生物合成都是从**天冬氨酸激酶**(aspartokinase)催化的天冬氨酸磷酸化生成**天冬氨酰-β-磷酸**(aspartyl-β-phosphate)开始的。我们已经看到代谢途径的调控，通常发生在该途径的第一个关键步骤。因此可能会推测赖氨酸、甲硫氨酸和苏氨酸的生物合成是作为一个群体被调控的。但实际上这些途径中的每一个都是独立调控的。*E. coli* 中有 3 种天冬氨酸激酶的同工酶，分别对应于这 3 种氨基酸的合成，既反馈抑制酶的活性，也阻遏酶的合成。此外，在分支点处，该分支产生的氨基酸，通过反馈抑制控制途径的方向。

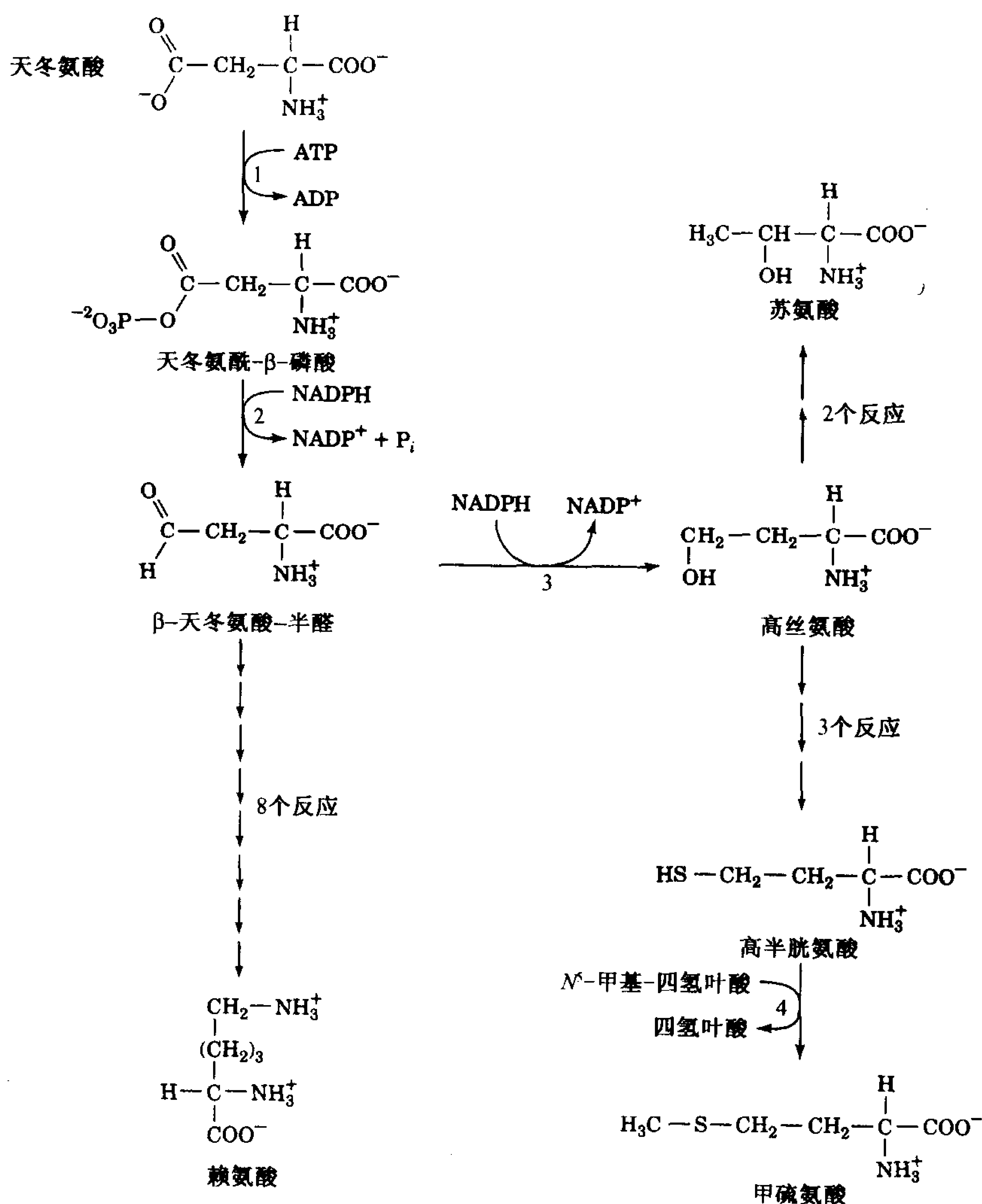


图 20-30 天冬氨酸家族氨基酸：赖氨酸、甲硫氨酸和苏氨酸的生物合成
途径中涉及的酶是：(1)天冬氨酸激酶。(2)β-天冬氨酸-半醛脱氢酶。(3)高丝氨酸脱氢酶。(4)甲硫氨酸合成酶(一种依赖于辅酶 B_{12} 的酶)。

646

甲硫氨酸合酶(methionine synthase, 也叫**高半胱氨酸甲基转移酶**, homocysteine methyltransferase)以 N^5-甲基 THF 为甲基供体, 催化高半胱氨酸的甲基化, 形成甲硫氨酸(图 20-16 和图 20-30 中的反应 4)。甲硫氨酸合酶是哺乳动物中除了甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶(见节 19-2E)以外, 惟一和辅酶 B_{12}相关的酶。但在甲硫氨酸合酶中, 辅酶 B_{12}的 Co 离子和一个甲基轴向配位形成 **甲基钴胺素**(methylcobalamin), 而不是像甲基丙二酸单酰-CoA 变位酶中那样通过一个 5′-腺苷基作用(图 19-14)。Martha Ludwig 和 Rowena Matthews 测定的单体 *E. coli* 甲硫氨酸合成酶 1227 个残基中与甲基钴胺素结合的 246 残基片段的 X 射线结构和甲基丙二酸单酰 CoA 变位酶

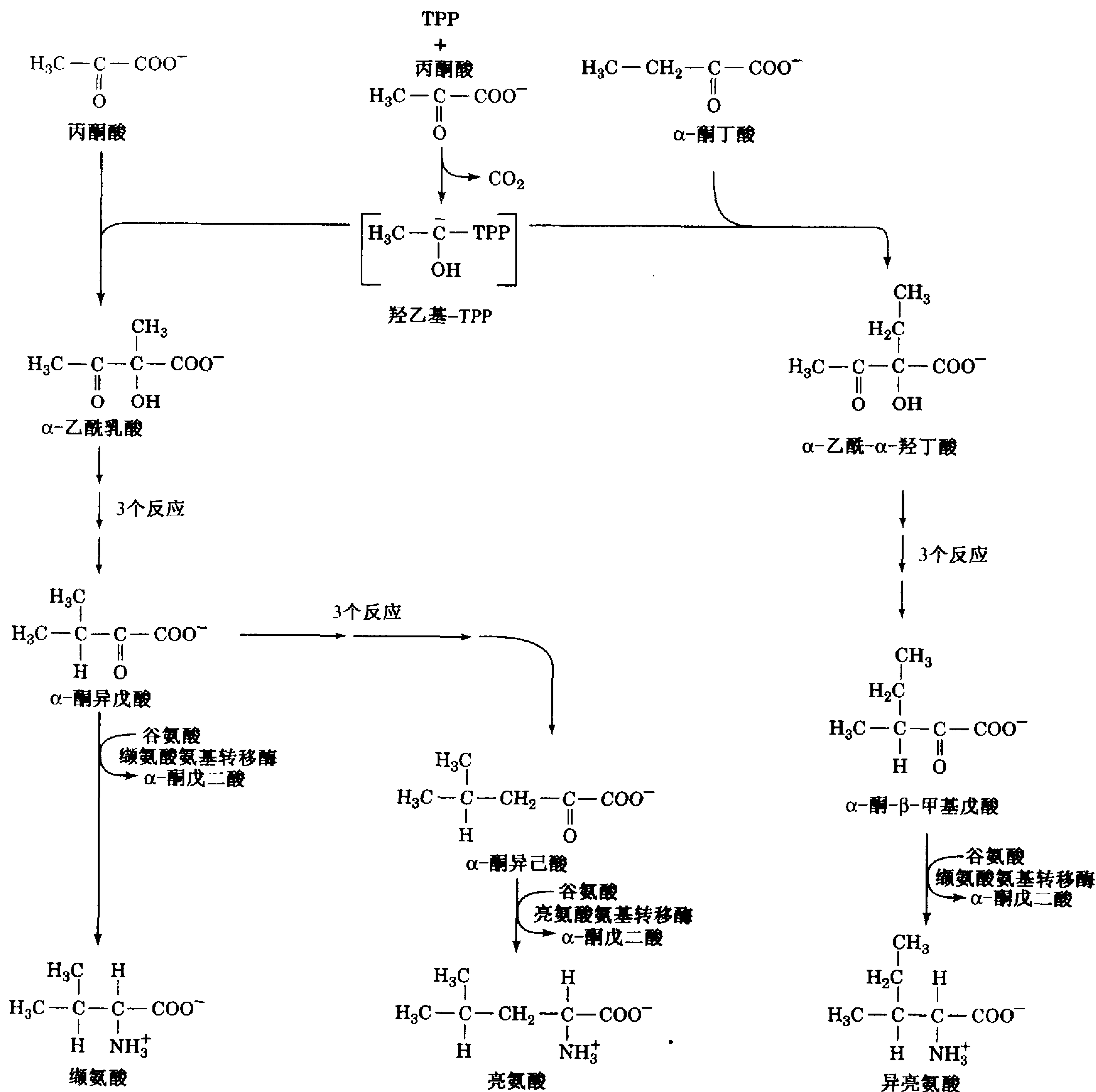


图 20-31 丙酮酸家族氨基酸:异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸的生物合成

第一个酶是乙酰乳酸合成酶(一种 TPP 酶), 它催化 2 个反应:一个反应引向缬氨酸和亮氨酸, 另一个反应引向异亮氨酸。注意, 缬氨酸氨基转移酶也可以分别从相应的 α-酮酸合成缬氨酸和异亮氨酸。

的 X 射线结构(图 19-16)具有相似的折叠方式。在两种酶的结构中,辅酶的 5,6-二甲基苯并咪唑(DMB)基(图 19-14)不像在游离辅酶中那样与 Co 离子配位,而是转向一边,结合在一个独立的口袋中,并被酶的 His 侧链取代。 647

最近发现血液中高浓度高半胱氨酸是心血管疾病的一个重要的危险因素。因此,食用足量的叶酸可能对缓解这种状况有效,叶酸是 THF 的维生素前体(见节 20-4D)。

丙酮酸家族:亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸

缬氨酸和异亮氨酸的生物合成途径相同,都以丙酮酸作为起始反应物,只是一系列反应的第一步不同(图 20-31)。依赖于硫胺素焦磷酸的这步反应与丙酮酸脱羧酶(图 14-20)和转酮酶(图 14-31)所催化的反应相似。丙酮酸与 TPP 形成加合物,然后脱羧生成羟乙基-TPP。这个共振稳定的碳负离子,或在合成缬氨酸途径中加到第二个丙酮酸分子的酮基上形成**乙酰乳酸**(acetolactate),或在合成异亮氨酸时加到 **α-酮丁酸**(α-ketobutyrate)的酮基上生成 **α-乙酰-α-羟基丁酸**(α-aceto-α-hydroxybutyrate)。亮氨酸的生物合成途径是从缬氨酸途径分支出来的。这 3 条途径都是从丙酮酸而不是从某一种氨基酸开始的,每条途径的最后一步反应都依赖于 PLP,从谷氨酸转移一个氨基而生成氨基酸。 648

芳香族氨基酸:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸 649

芳香族氨基酸的前体是糖酵解的中间产物磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)和赤藓糖-4-磷酸(戊糖磷酸途径中的一个中间产物;图 14-29)。它们缩合形成 **2-酮-3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸**(2-keto-3-deoxy-D-arabinoheptulosonate-7-phosphate,图 20-32)。这个 C_7 化合物环化并最终转化为**分支酸**(chorismate),这是色氨酸合成的分支点。分支酸或转化为**氨茴酸**(anthranilate),再生成色氨酸;或转化为**预苯酸**(prephenate),再生成酪氨酸或苯丙氨酸。虽然哺乳动物通过苯丙氨酸的羟化合成酪氨酸(图 20-22),但是许多微生物直接从预苯酸合成酪氨酸。酪氨酸和苯丙氨酸合成的最后一步是通过转氨作用添加一个氨基。合成色氨酸时,是丝氨酸添加到吲哚环上。

吲哚被导入色氨酸合酶两个活性中心间的通道

色氨酸生物合成的最后两步反应(图 20-32 中的反应 3 和 4)都是由**色氨酸合酶**(tryptophan synthase)催化的:

1) 这一由 $\alpha_2\beta_2$ 组成的双功能酶的 α 亚基(29kDa)裂解**吲哚-3-甘油磷酸**(indole-3-glycerol phosphate),产生吲哚和甘油醛-3-磷酸;

2) β 亚基(43kDa)通过一个依赖于 PLP 的反应,将吲哚与丝氨酸相连,生成色氨酸。

单独的每一个亚基都具有酶活性,但是当亚基结合成 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体时,反应速度和底物亲和力都增加 1~2 个数量级。中间产物吲哚并不游离存在于溶液中,显然是酶截留了它。

由 Craig Hyde, Edith Miles 和 David Davies 测定的 *Salmonella typhimurium* 色氨酸合酶的 X 射线结构解释了上述现象。该蛋白质形成一个长 150 Å、二重对称的 α-β-β-α 复合物,其中相邻的 α 和 β 亚基的活性中心相隔约 25 Å(图 20-33)。*这些活性中心通过一个充满溶剂的通道相连,该通道的宽度足以让中间底物吲哚通过。*这个结果说明下面的一系列事件:吲哚-3-甘油磷酸底物通过一个开口,即酶的"前门",进入活性中心与 α 亚基结合,甘油醛-3-磷酸产物通过同一路线离开。与此相似,β 亚基的活性中心也有一个面向溶剂的"前门",丝氨酸进入,色氨酸由此离去。 650

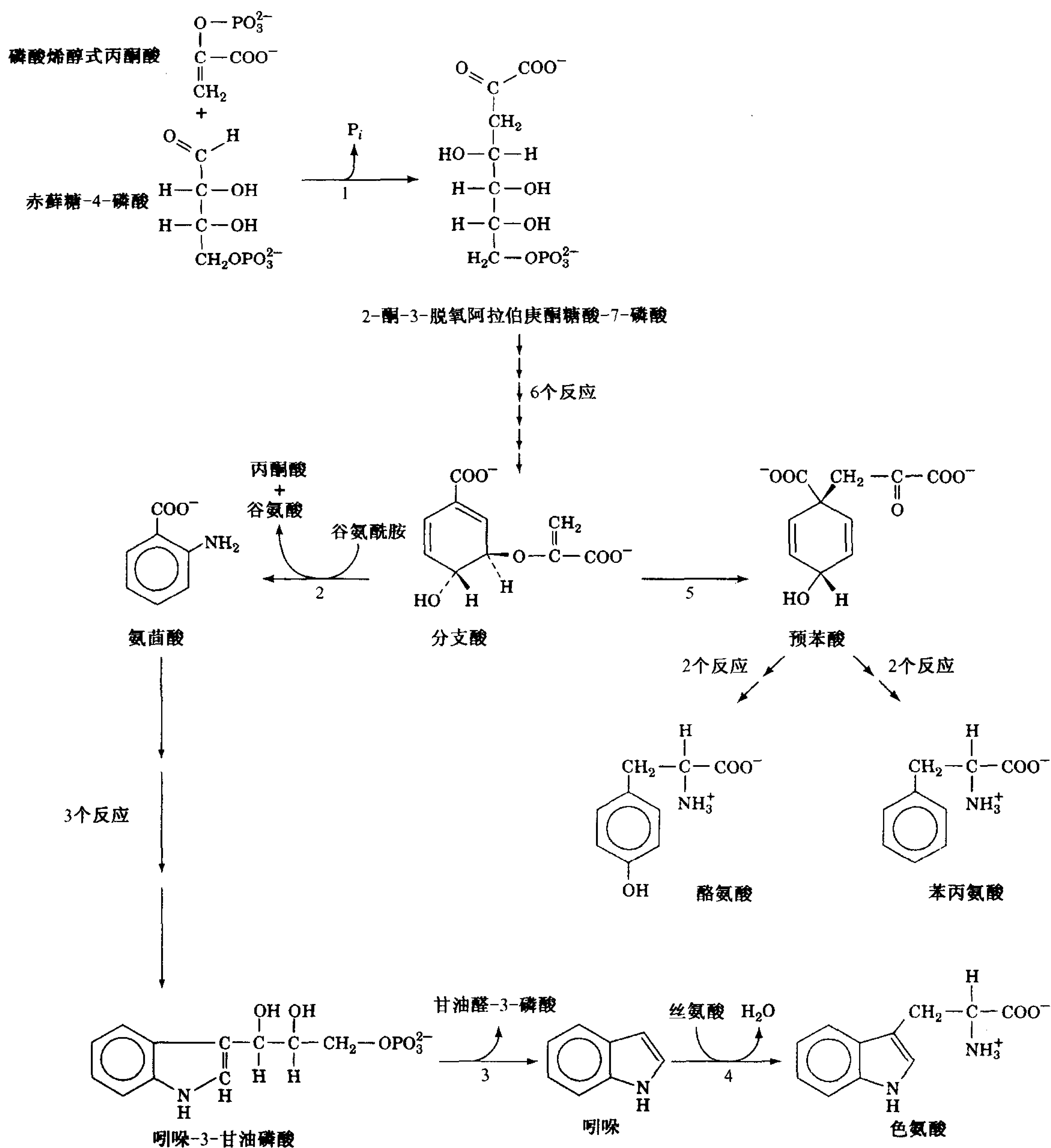


图 20-32　苯丙氨酸、色氨酸和酪氨酸的生物合成

涉及到的酶是：(1)2-酮-3-脱氧-D-阿拉伯庚酮糖酸-7-磷酸合成酶。(2)氨茴酸合酶。(3)色氨酸合酶，α亚基。(4)色氨酸合酶，β亚基(一种依赖于 PLP 的酶)。(5)分支酸变位酶。

这两个活性中心也都有"后门"，并通过通道相连。吲哚中间产物可能在两个活性中心之间经由通道扩散，因此不能逃逸到溶剂中。

两个反应的中间产物直接从酶的一个活性中心转移到另一个活性中心，这种现象称为**通道转移**(channeling)。通道转移既可以保护中间产物免受降解，也可以阻止其丢失，从而增加了代

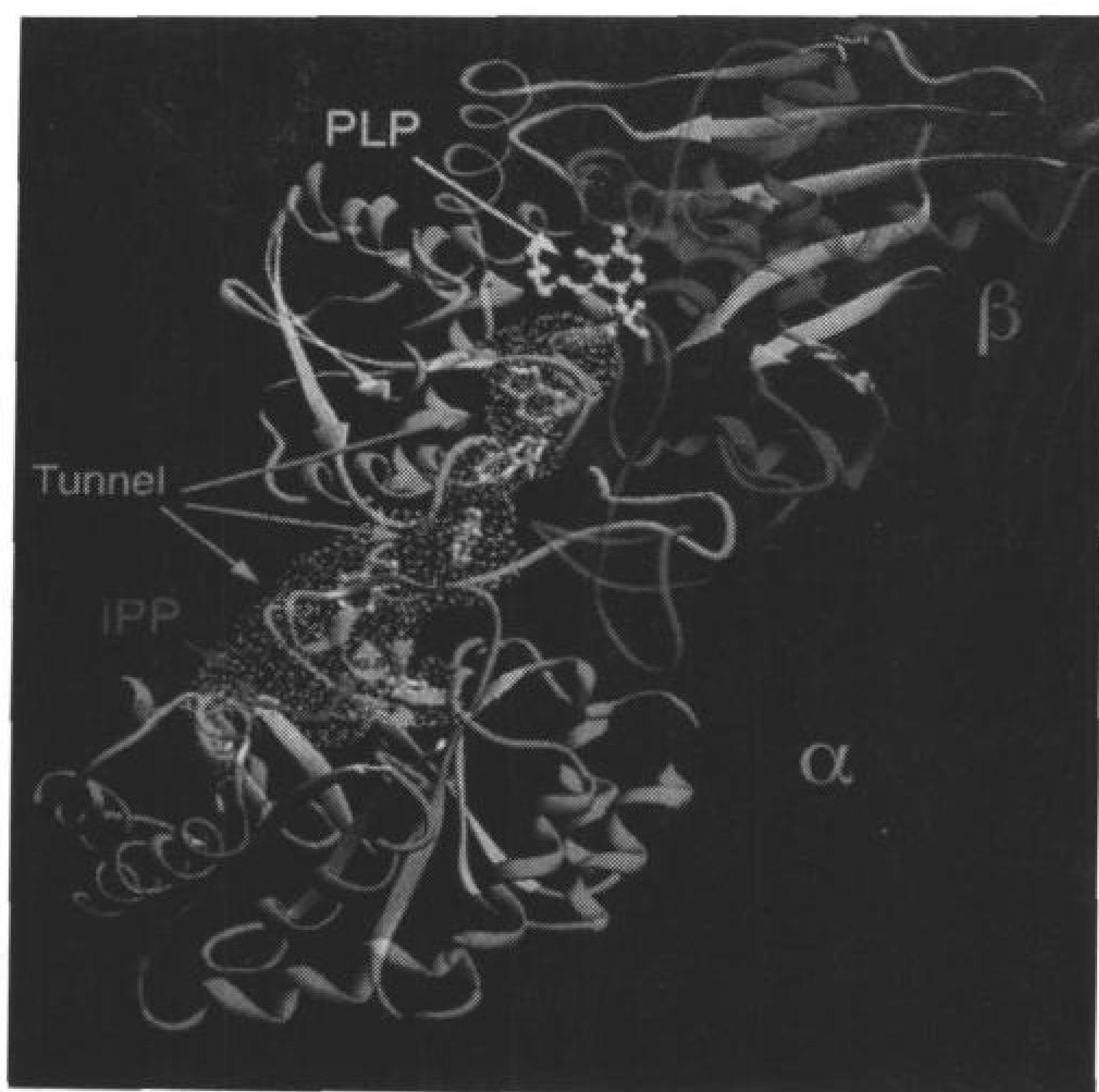


图 20-33 *S. typhimurium* 的双功能色氨酸合酶的带状示意图

图中只显示了 αββα 异四聚体的一个 αβ 亚基。α 亚基为蓝色，β 亚基的 N 末端结构域为橙色，它的 C 末端结构域为红橙色，β 折叠为棕色。α 亚基的活性中心可以通过与之结合的竞争性抑制剂——吲哚丙醇磷酸(indolepropanol phosphate, IPP, 红色的球棒模型)鉴别，而 β 亚基的活性中心以它的 PLP 辅酶(黄色的球棒模型)为标记。连接 α 和 β 活性中心长约 25 Å"通道"的溶剂可及表面用黄色的点表示。几个吲哚分子(绿色的球棒模型)被模建在通道中，显示通过通道足够宽，可以让吲哚从一个活性中心到另一个活性中心。(Courtesy of Craig Hyde, National Institutes of Health)

谢途径的速度。通道转移对吲哚而言尤为重要，否则这种非极性分子可以通过扩散，穿过细胞质和外膜而逃离细菌细胞。

为了利用通道转移增加色氨酸合成酶的催化效率，①相连接的活性中心必须是成双的，这样它们催化的两个反应就可以同时协调发生，②当底物与 α 亚基结合后，其活性中心("前门")必须关闭，以保证产物吲哚通过通道("后门")到 β 亚基，而不是逃逸到溶液中。各种实验证据表明，从 β 亚基活性中心共价转化衍生出来的别构信号，有助于一系列事件的发生，它们使酶在开和关之间转换，开是酶的低活性构象，底物与之结合，关是酶的高活性构象，吲哚不能逃逸。

组氨酸的生物合成

组氨酸的 6 个碳原子中，有 5 个来自 **5-磷酸核糖-α-焦磷酸**(5-phosphoribosyl-α-pyrophosphate, PRPP; 图 20-34)，这种磷酸糖中间产物也用于嘌呤和嘧啶核苷酸的生物合成(见节 22-1A 和节 22-2A)。组氨酸的第 6 个碳来自 ATP，没有被掺入到组氨酸中的 ATP 的其他原子，以 **5-氨基咪唑-4-氨甲酰基核苷酸**(5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide)的形式释放(图 20-34，反应 2)，它也是嘌呤生物合成的中间产物。

组氨酸不寻常地从一种嘌呤(**N^1-5′-磷酸核糖 ATP**, N^1-5′-phosphoribosyl ATP 图 20-31 中反

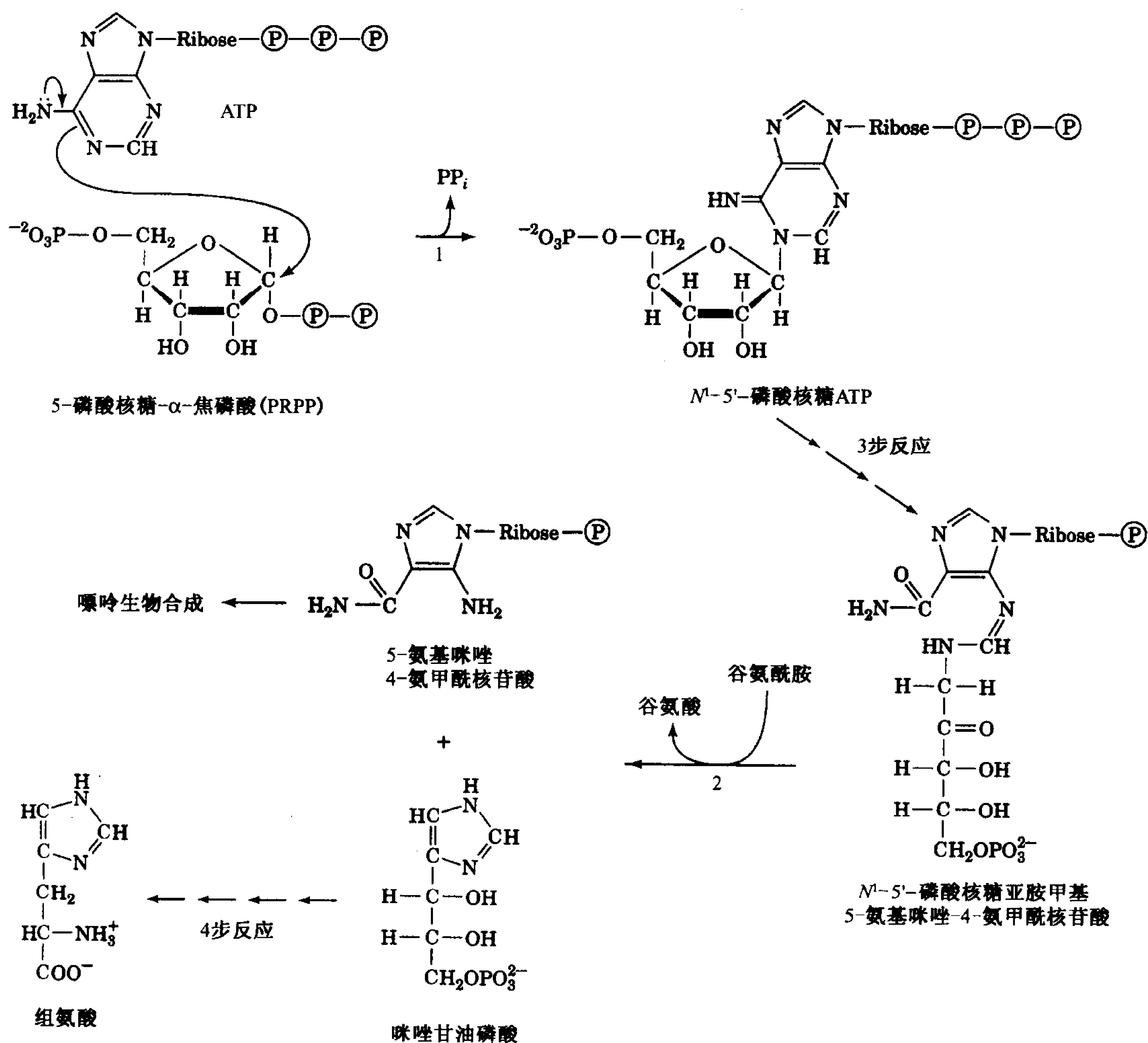


图 20-34 组氨酸的生物合成

涉及到的酶是:(1)ATP 磷酸核糖转移酶。(2)谷氨酰胺氨基转移酶。

应 1 的产物)生物合成而来,这一点已被作为支持"生命起源于 RNA(见节 3-3C)"这一假说的证据。正如我们所知,组氨酸残基常作为酶活性中心的组成,起亲核和(或)一般酸-碱催化剂的作用。RNA 具有催化性质的发现提示,嘌呤的咪唑组分在这些 RNA 酶中起相似的作用。这也进一步说明组氨酸的生物合成途径,是生命向更有效的以蛋白质为基础的形式过渡的"化石"。

6. 氨基酸代谢的其他产物

某些氨基酸除了作为蛋白质构件的主要功能外,也是多种重要的生物分子,包括核苷酸和核苷酸辅酶、血红素以及多种激素和神经递质的必需前体。在这一节中,我们要讨论合成某些这类物质的途径,核苷酸的生物合成将在第 22 章中讨论。

651

A. 血红素的生物合成和降解

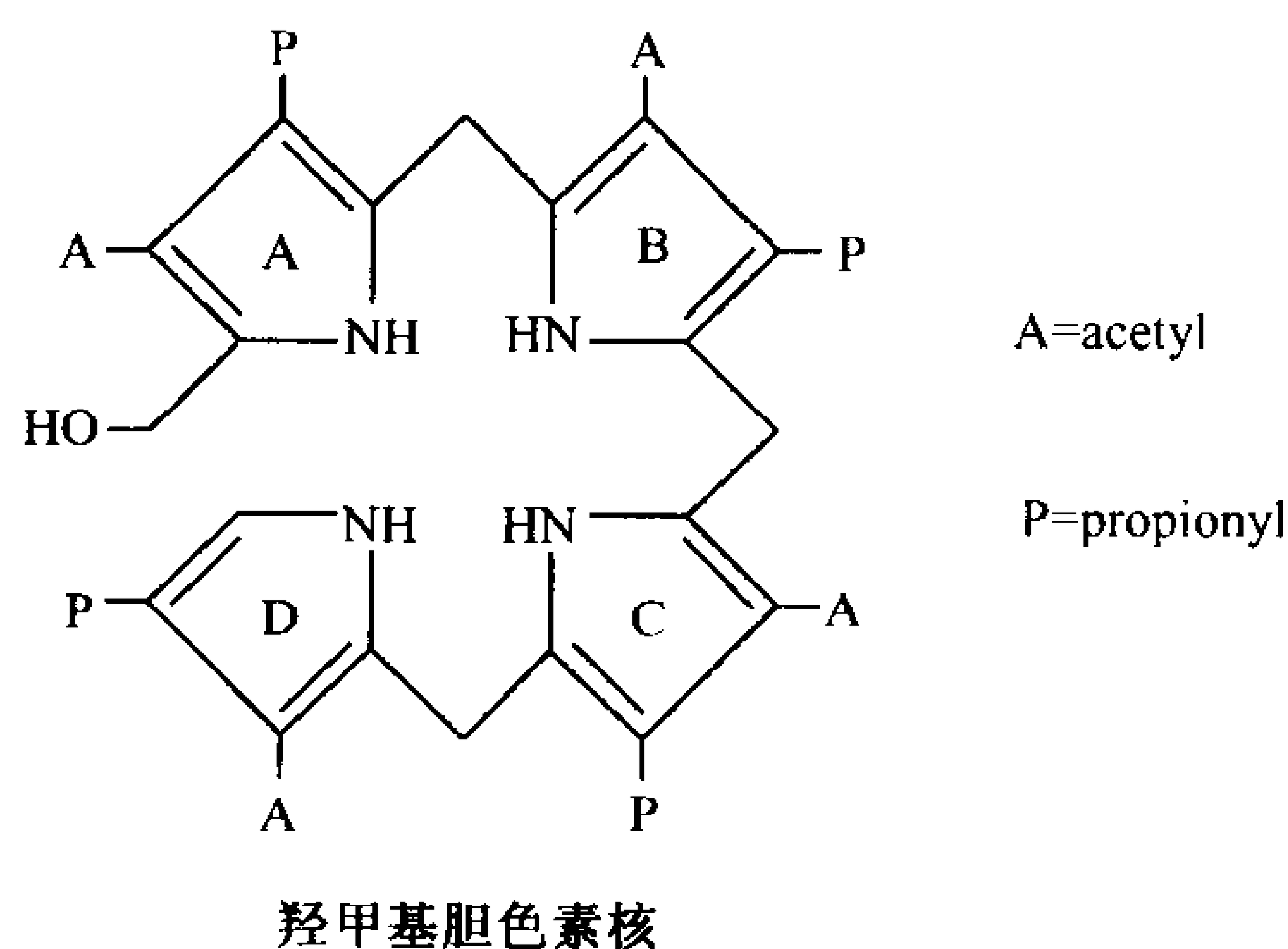
正如我们所知道的，血红素是一种含 Fe 辅基，是许多蛋白质，尤其是血红蛋白、肌红蛋白和细胞色素的必需组分。血红素生物合成的起始反应与其他四吡咯化合物的生成是共同的，包括植物和细菌中的叶绿素(图 18-2)和细菌中的辅酶 B_{12}(图 19-14)。

阐明血红素生物合成途径涉及一些有趣的探测工作。David Shemin 和 David Rittenberg 是那些最早利用同位素示踪法研究代谢途径人中的两位，在 1945 年，他们发现*血红素中所有的碳和氮原子都可以从乙酸和甘氨酸衍生而来*。血红素的生物合成一部分发生在线粒体中，一部分在细胞质中(图 20-35)。线粒体中的乙酸通过柠檬酸循环代谢生成琥珀酰-CoA，后者与甘氨酸缩合产生 CO_2 和 **δ-氨基乙酰丙酸**(δ-aminolevulinic acid, ALA)。ALA 被转运到细胞质中，与第二分子 ALA 结合生成**胆色素原**(porphobilinogen, PBG)，反应由需要 Zn 的**胆色素原合酶**(porpholilinogen synthase)催化。

653

铅对 PBG 合酶的抑制作用是急性铅中毒的主要原因之一。实际上，有人提出，与神经递质 **γ-氨基丁酸**(γ-aminobutyric acid 见节 20-6B)相似的 ALA 在血液中的累积，是导致经常伴随着铅中毒出现的精神极度不安的原因。

血红素生物合成的下一个阶段是由**胆色素原脱氨酶**(porpholilinogen deaminase, 也称**尿卟啉原合酶**, uroporphyrinogen synthase)和**尿卟啉原 III 共合酶**(urophophyrinogen III cosynthase)催化的一系列反应，4 分子 PBG 缩合形成**尿卟啉原 III**(uroporphyrinogen III)。起始产物**羟甲基胆色素核**(hydroxymethylbilane III, 见右边)是线形四吡咯环化形成的。**原卟啉 IX**(protoporphyrin IX)加上 Fe 即形成血红素，原卟啉 IX 是从尿卟啉原 III 经一系列反应生成的，这一系列反应是由：①**尿卟啉原脱羧酶**(porphyrinogen decarboxylase)催化，使所有 4 个乙酸侧链(A)脱羧形成甲基(M)；②**粪卟啉原氧化酶**(coproporphyrinogen oxidase)催化，使 2 个丙酸侧链(P)氧化脱羧生成乙烯基(V)；以及③**原卟啉原氧化酶**(protoporphyrinogen oxidase)催化，将连接吡咯环的亚甲基氧化为次甲基。在粪卟啉原氧化酶催化反应时，卟啉被运回到线粒体中。在血红素生物合成的最后一步反应中，**亚铁原卟啉合成酶**(ferrochelatase)将 Fe(II)插入到原卟啉 IX 中。



羟甲基胆色素核

血红素生物合成的调控

血红素生物合成的两个主要场所是红细胞和肝脏，红细胞合成体内血红素的约 85%，肝脏合成其余的大部分。在肝脏，血红素合成的水平是根据代谢状况而调节的。例如，含血红素的细胞色素 P450(见节 17-5A)的合成随着解毒的需要而波动。相反，红细胞中的血红素合成则是一次性事件；当细胞成熟时血红素和蛋白质的合成就停止了，因此血红蛋白必须能维持在红细胞的整个生命期(约 120d)。

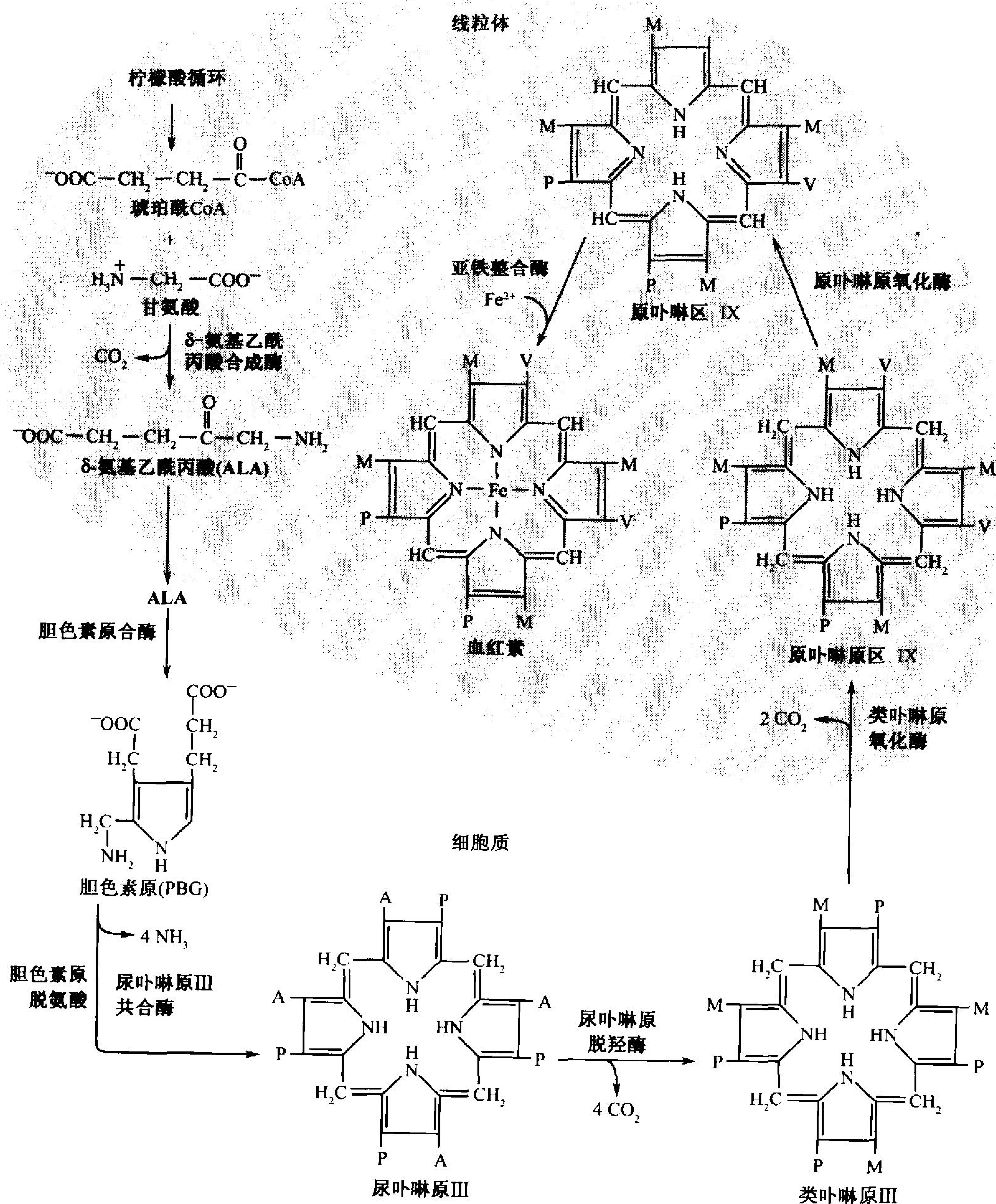


图 20-35 血红素生物合成途径

δ-氨基乙酰丙酸(ALA)是在线粒体中由 ALA 合酶从琥珀酰 CoA 和甘氨酸催化合成的。ALA 被转运到细胞质中，在细胞质中，2 分子 ALA 缩合生成 PBG，4 分子 PBG 缩合生成一个卟啉环。接着的 3 步反应包括吡咯环取代基的氧化，产生原卟啉 IX，后者在其生成过程中被转运回到线粒体内。亚甲基被氧化后，亚铁原卟啉合酶催化 Fe^{2+} 的插入产生血红素。A、P、M 和 V 分别代表乙酰基、丙酰基、甲基和乙烯基($—CH_2═CH_2$ ①)。来源于乙酸羧基的碳原子用红色表示。

---

① 应为 $—CH═CH_2$ 。——译者注

在肝脏，血红素生物合成的主要调控靶是 ALA 合酶，该酶催化途径中的第一个限速步骤。血红素，或其 Fe(Ⅲ)氧化产物，**氯高铁血红素**(hemin)，通过反馈抑制调控酶的活性，它可以抑制 ALA 合酶从其合成地点细胞质转移到在线粒体中的反应中心(图 20-35)，并且阻抑 ALA 合酶的合成。

在红细胞中，血红素对其生物合成起不同的作用。血红素可以促进而不是阻抑**网织红细胞**(reticulocytes，未成熟的红细胞)中的蛋白质合成。虽然网织红细胞合成的蛋白质中最主要的是珠蛋白，但是血红素也可以诱导网织红细胞合成血红素生物合成所需的酶。而且，在红细胞中血红素生物合成的限速步骤可能是亚铁原卟啉合酶和胆色素原脱氨酶反应，而不是 ALA 合酶反应。这一点与下述推测是一致的，即当红细胞中血红素生物合成被"打开"时，其所有步骤都以最大速度进行，而不是由任何一个步骤限制整个途径的通量。血红素促进珠蛋白的合成，也确保血红素和珠蛋白按正确的比例合成，以便组装成血红蛋白(见节 27-3D)。血红素生物合成的基因缺陷会导致**卟啉沉着症**(porphyrias，见框 20-2)。

框 20-2 健康和疾病的生物化学

卟啉沉着症

肝脏或红细胞中血红素生物合成的缺陷导致卟啉和(或)其前体的累积，因此被称作卟啉沉着症。已知有两种这样的缺陷可以影响红细胞：尿卟啉原 III 共合酶缺陷(先天性红细胞生成性卟啉沉着症，congenitial erthropoietic porphyria)和亚铁原卟啉合酶缺陷(红细胞生成性原卟啉沉着症，erythropoietic protoporphyria)。前者导致尿卟啉原衍生物的累积。排泄这些化合物使尿液呈红色；它们沉积在牙齿上使牙齿变成红棕色；它们沉积在皮肤中，使皮肤对光极为敏感，导致溃疡并形成难看的疤。在患此症的病人中也可以观察到毛发生长加快，纤细的毛发可能覆盖脸和四肢的大部分。这些症状促使人们提出这样的推测：有关狼人的传说是具有生化基础的。

影响肝脏的最常见的卟啉沉着症是胆色素原脱氨酶缺陷症(**急性间歇性卟啉沉着症**，acuteintermittent porphyria)。这种疾病的特点是间歇发作的腹痛和神经机能障碍。在发作期间以及发作之后，过量的 ALA 和 PBG 被排入尿液中。由于在非肝脏细胞中从 PBG 过量合成的卟啉的排泄，虽然皮肤不会变得极度光敏感，但是尿液可能变成红色。在美国独立战争期间统治英格兰的国王乔治三世，曾被众人描绘成一个疯子，实际上是典型的急性间歇性卟啉沉着症。据说他的尿液为葡萄酒颜色，有几个后代也被诊断患有这种疾病。如果乔治三世没有遗传这种代谢缺陷，那么美国历史可能就会大不相同了。

血红素降解

654

红细胞在其生活末期就被从循环系统中清除，其组分被降解。血红素分解代解(图 20-36)始于氧化性裂解，血红素氧化酶催化卟啉 A 环和 B 环之间裂解，生成**胆绿素**(biliverdin)，一种绿色线形的四卟咯分子。然后胆绿素的中央次甲基桥(在 C 环和 D 环之间)被还原生成红橙色的**胆红素**(bilirubin)。碰撞导致的青肿，在愈合时的颜色变化，是血红素降解肉眼可见的表现形式。

在生成胆绿素的反应中，A 环和 B 环之间的次甲基桥碳原子以 CO 形式被释放，CO 是血红素的一种强配体(与血红蛋白的亲和力比 O_2 高 200 倍，见节 7-1A)。因此，即使在没有空气污染时，也有约 1% 的血红蛋白结合位点被 CO 阻断。

高亲脂性的胆红素不溶于水溶液。与其他脂亲性代谢物如游离脂肪酸一样，胆红素与血清

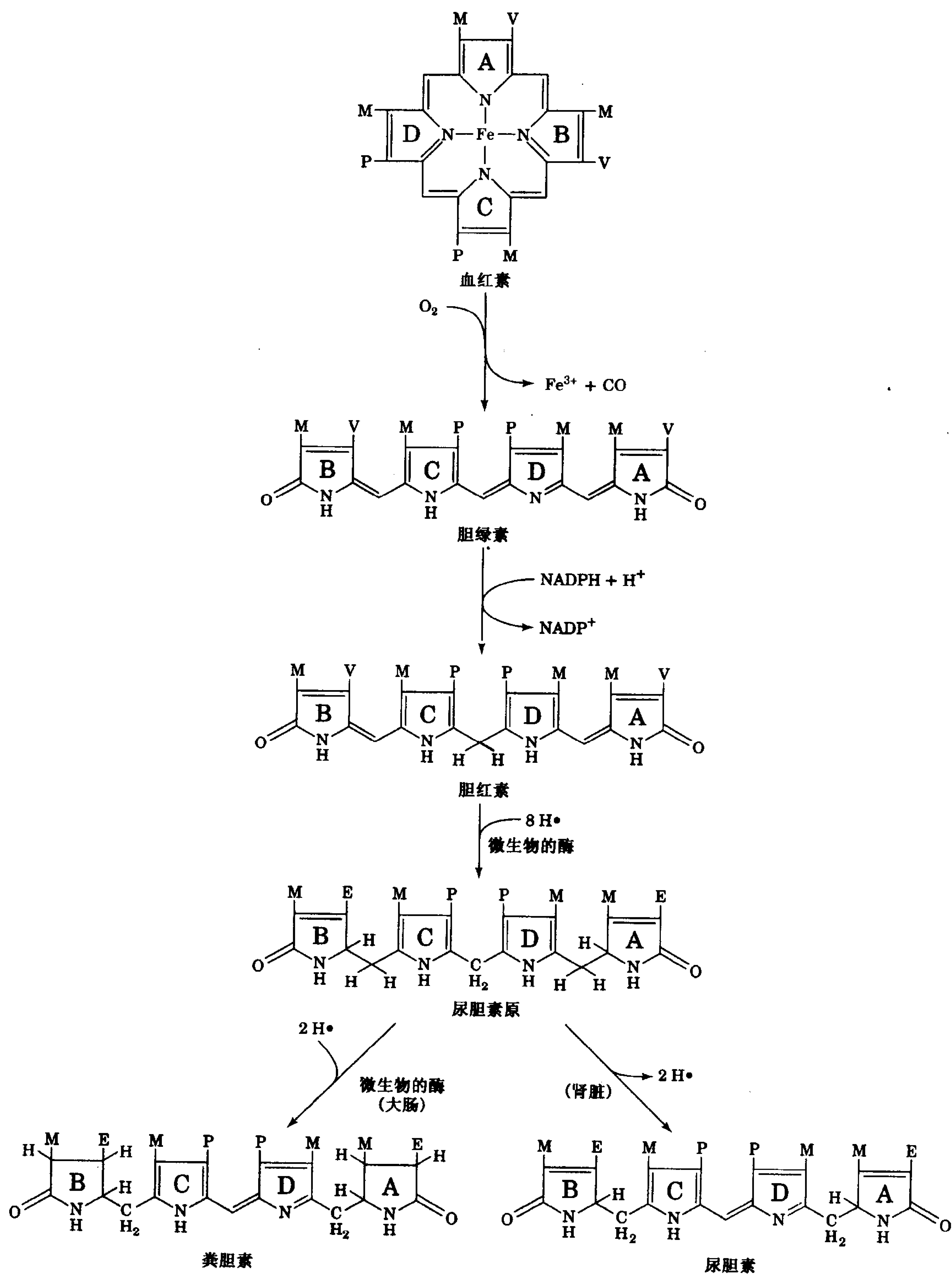
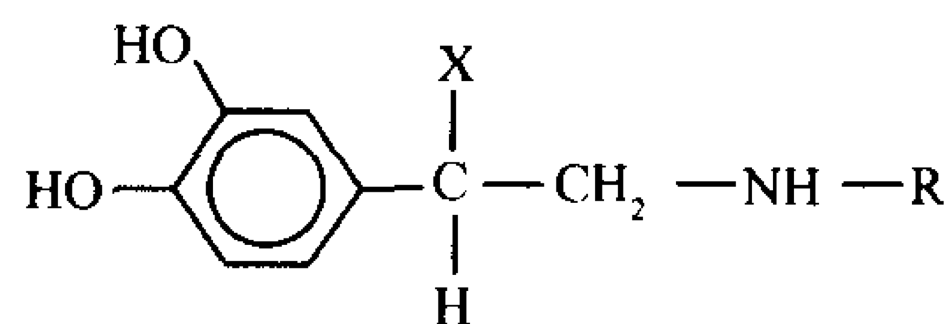


图 20-36　血红素降解途径

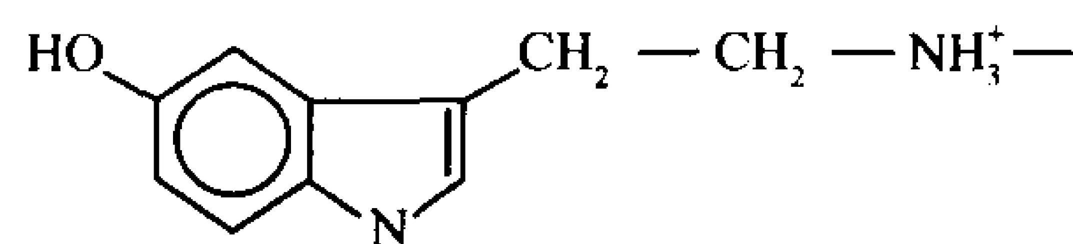
M、V、P 和 E 分别代表甲基、乙烯基、丙酸基和乙基。

白蛋白形成复合物在血液中转运。胆红素衍生物被分泌到胆囊，大部分被大肠中的细菌进一步酶解。产生的**尿胆素原**(urobilinogen)一部分被重新吸收，并通过血液循环转运到肾脏，在那儿被转化为黄色的**尿胆素**(urobilin)排出体外，致使尿液具有其特征的颜色。但是大部分尿胆素原被细菌分解转化为深红褐色的**粪胆素**(stercobilin)，即粪便的主要色素。

当血液中含有过量胆红素时，这种高度不溶性物质的沉积使皮肤颜色加深，并使眼白部分呈现黄色，这种情况即被称为**黄疸**(jaundice，法语中 jaune 是黄色的意思)，黄疸是红细胞裂解速度过高、或肝脏功能障碍、或胆管阻塞的信号。新生儿，尤其是早产儿，常会出现黄疸，因为他们缺少降解胆红素的酶。黄疸婴儿可以用荧光灯的光进行光浴治疗；这种光化学反应将胆红素转化为能被婴儿降解和排泄的可溶性异构体。



X=OH，R=CH_3　肾上腺素
X=OH，R=H　去甲肾上腺素
X=X，R=H　多巴胺

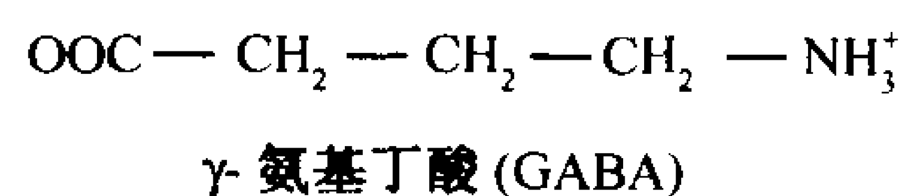


656

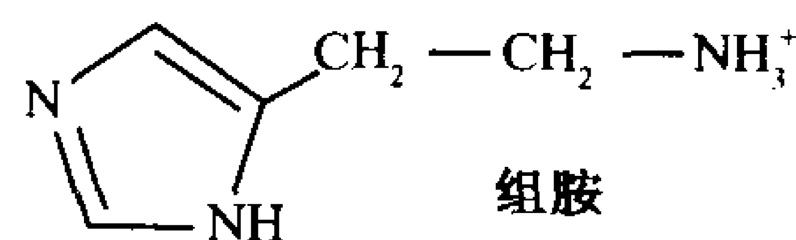
5-羟色胺

B. 生理活性胺的生物合成

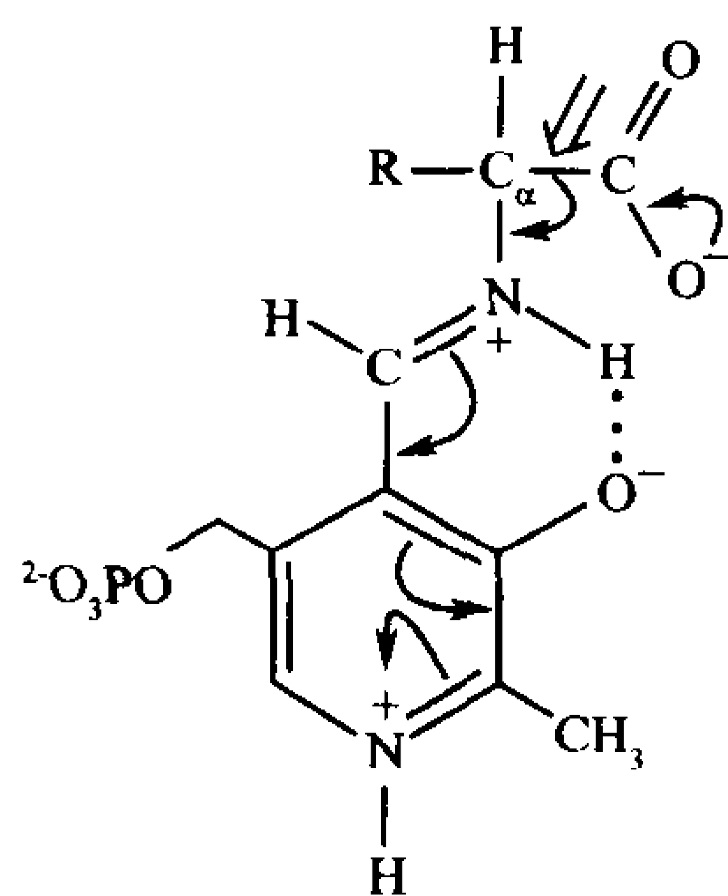
肾上腺素(epinephrine 或 adrenalin①)、**去甲肾上腺素**(norepinephrine)、**多巴胺**(dopamine)、**5-羟色胺**(serotonin 或 5-hydroxytryptamine)、**γ-氨基丁酸**(γ-aminobutyric acid，GABA)以及**组胺**(histamine，见右图)都是从氨基酸衍生而来的激素和/或神经递质。正如我们所知，肾上腺素可以活化肌肉腺苷酸环化酶，从而促进糖原降解(见节 15-3C)；多巴胺在脑部某些区域的生成缺陷与**帕金森症**(Parkinson's disease)有关，这是一种退行性变化，导致"震颤"；5-羟色胺会引起平滑肌收缩；GABA 是脑组织中主要的抑制性神经递质之一；组胺不仅与胃酸分泌的调控有关(见框 10-4)，而且也与变态反应有关(因为变态反应病人服用抗组胺药物后可以得到缓解)。



γ-氨基丁酸(GABA)

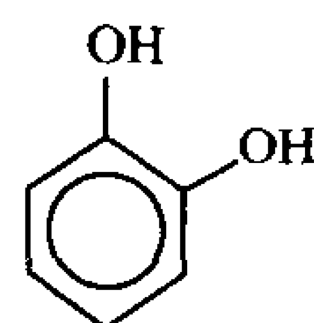


组胺



这些生理活性胺的生物合成，都涉及相应的前体氨基酸的脱羧。氨基酸脱羧酶是 PLP 依赖性酶，促使 PLP 与底物形成 PLP-Schiff 碱，以稳定 C_α—COO^- 键断裂时生成的 C_α 碳负离子(见节 20-2A)(左图)。

组胺(从组氨酸)和 GABA (从谷氨酸)的生成均只需一步反应；从色氨酸合成 5-羟色胺需要一步脱羧反应和一步羟化反应。各种**儿茶酚胺**(catecholamines)——多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素——与儿茶酚有关，是从酪氨酸顺序合成的(图 20-37)：



儿茶酚

1) 经过一步需要 5,6,7,8-四氢生物蝶呤(图 20-24)的反应，酪氨酸被羟化生成了 **3,4-二羟苯丙氨酸**(3,4-dihydroxyphenylalanine，**L-多巴**)；

2) L-多巴脱羧生成多巴胺；

3) 第二次羟化生成去甲肾上腺素；

① adrenalin 疑为 adrenaline 之误。——译者注

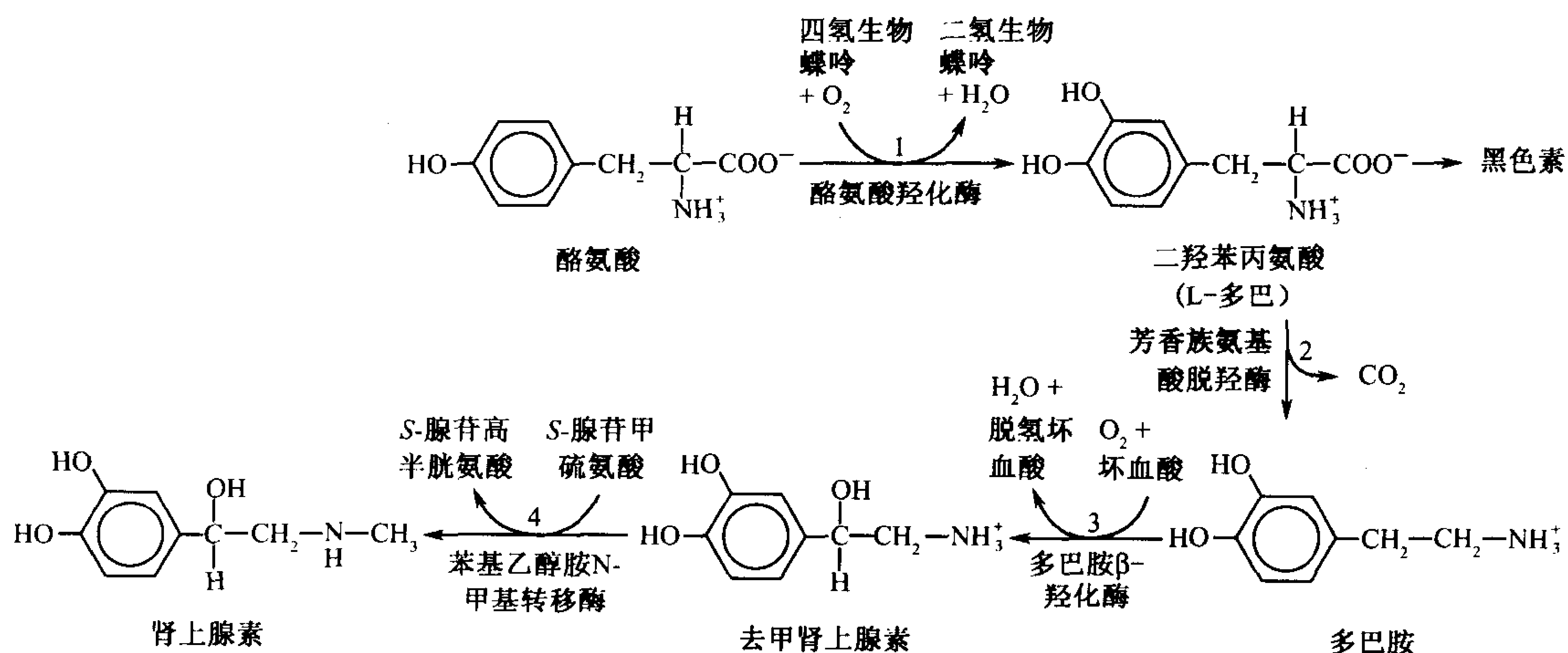


图 20-37 从酪氨酸依次合成 L-DOPA、多巴胺、去甲肾上腺素和肾上腺素

L-DOPA(L-多巴)也是皮肤黑色素的前体。

4) 去甲肾上腺素的氨基被 *S*-腺苷甲硫氨酸甲基化(图 20-16)产生肾上腺素。

一个细胞产生特定的儿茶酚胺取决于细胞中具有途径中的哪一种酶。例如,在肾上腺髓质,肾上腺素是主要产物;在脑组织的某些区域,去甲肾上腺素更常见;在其他区域,这一合成途径则到多巴胺为止。在黑色素细胞中,L-DOPA 是红色素、黑色素的前体,它们的不规则交联多聚体使毛发和皮肤具有各自的颜色。

657

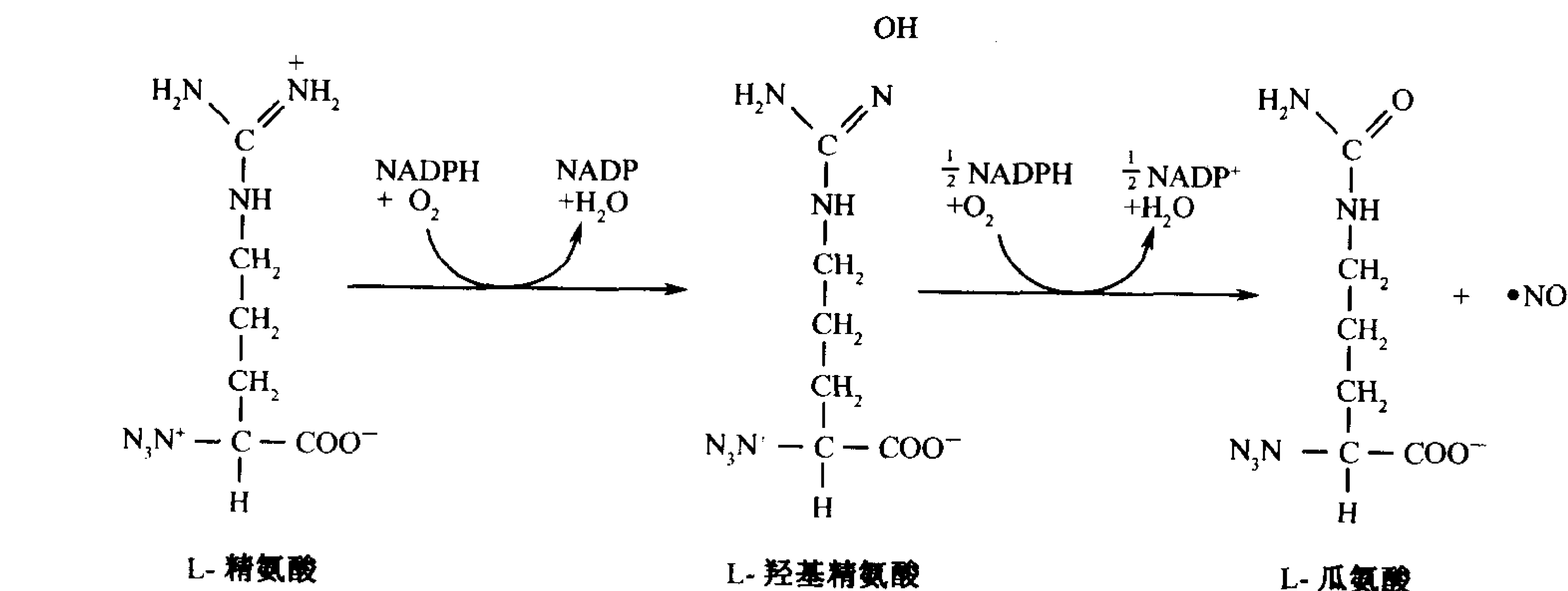
C. 氧化氮

精氨酸是原先被称为**内皮细胞(衍生)性舒缓因子**(endothelium-derived relaxing factor, EDRF)的前体,因为它是由血管内皮细胞合成的,可以使内皮细胞下面的平滑肌舒缓。血管舒张的信号分子并不像预料的那样是一个肽,而是稳定的自由基氧化氮 NO。证实 NO 是一种血管舒张因子的证据部分来自如下研究,即鉴定了 NO 是介导某些化合物如**硝化甘油**(nitroglycerin, 见左面)血管舒张效应的分解产物。硝化甘油常用于**心绞痛**(angina pectoris, 一种由于心肌供血不足而引起的疾病),可快速暂时性缓解胸部疼痛。

CH_2—CH—CH_2 (各连 O—NO_2)

硝化甘油

将精氨酸转化为 NO 和瓜氨酸的反应是由**氧化氮合酶**(nitric oxide synthase, NOS)催化的:



反应通过一个与酶结合的羟基精氨酸中间产物进行，并且需要一系列氧还辅酶。NOS 是由 125 到 160kDa 的亚基组成的同源二聚体蛋白，每个亚基含一分子 FMN、一分子 FAD、一分子四氢生物蝶呤（图 20-24）和一分子 Fe(III)-血红素。这些辅助因子有利于精氨酸的五电子氧化，产生 NO。 658

虽然 NO 的高反应性（半衰期约 5s）妨碍了 NO 在离开其合成部位约 1mm 以外的地方起作用，但是由于 NO 是气体，因而可以快速地扩散穿过细胞膜。NO 是由内皮细胞应答众多不同试剂和生理条件而产生的。神经细胞也可以合成 NO（神经细胞的 NOS 与内皮细胞的 NOS 约有 55% 的同源性）。这种不依赖于内皮细胞的 NO 合成，使大脑和其他动脉扩张，也是阴茎勃起的原因。脑组织中含有比体内其他组织更多的 NOS，说明 NO 是中枢神经系统功能所必需的。第三种类型的 NOS 是在白细胞（白血球）中发现的。这些细胞产生 NO 以便作为其细胞毒储备库中的一部分。NO 与超氧化物（见节 17-5B）结合产生高反应性羟基自由基，可杀死入侵的细菌。NO 的持续性释放在**内毒素性休克**（endotoxic shock，一种常常是致命的免疫系统对细菌感染的过度反应）、与炎症有关的组织损伤、以及中风导致的邻近神经元损伤（常常比中风本身危害更大）、而不是中风直接杀死神经元中，都起作用。

7. 固氮作用

生物体中最主要的化学元素是 O、H、C、N 和 P。O、H 和 P 元素广泛地以可代谢的形式（H_2O、O_2 和 P_i）存在。但是，C 和 N 的主要形式：CO_2 和 N_2 是极为稳定（不反应）的。例如，N≡N 三键的键能为 945kJ·mol^{-1}（对比 C—O 单键键能为 351kJ·mol^{-1}）。除少数例外情况，CO_2 只被光合有机体代谢（固定）（见第 18 章）。N_2 的固定作用更不常见；这种元素只被少数几种细菌转化为在代谢上有用的形式，这些细菌被称为**固氮菌**（diazatrophs）。

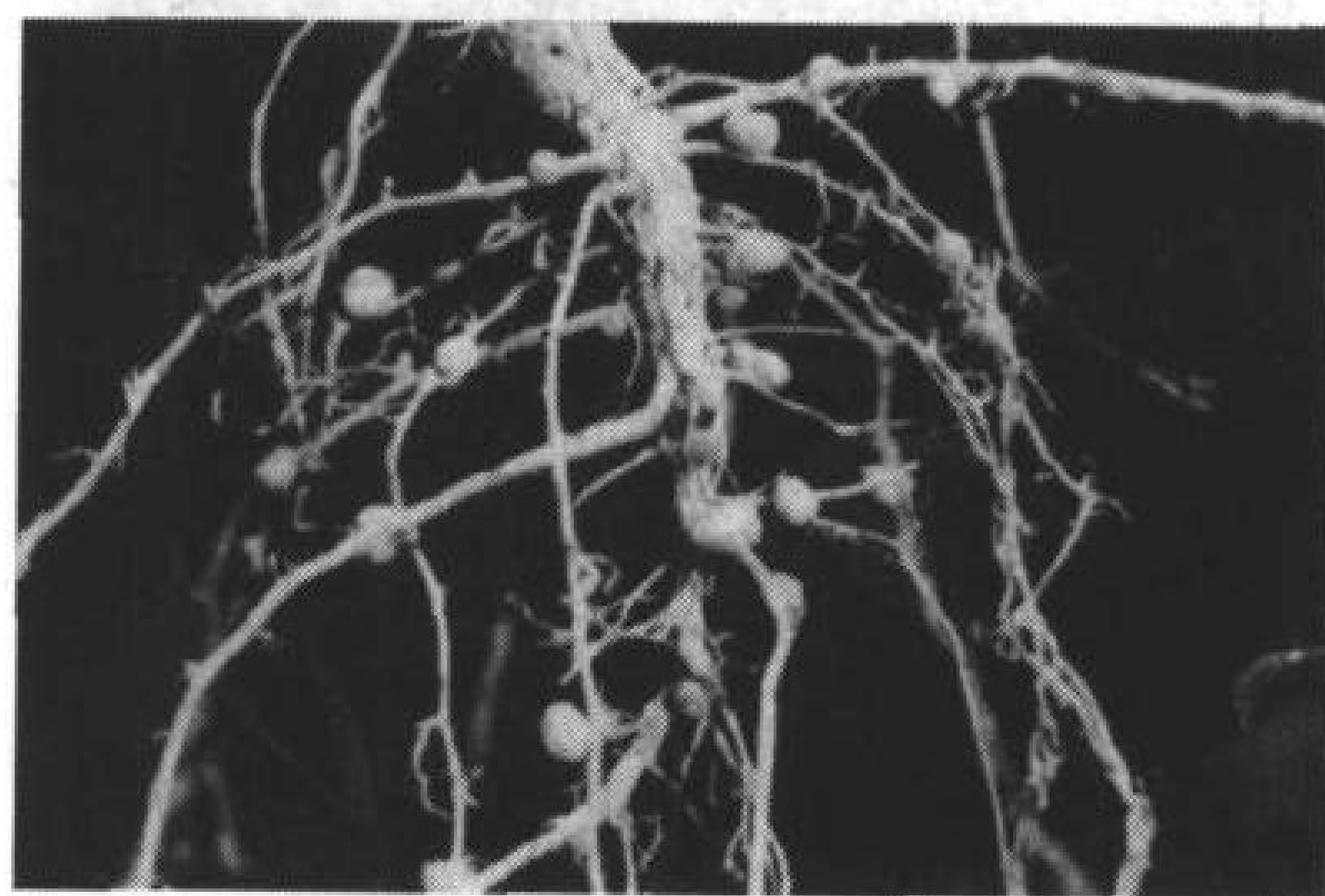
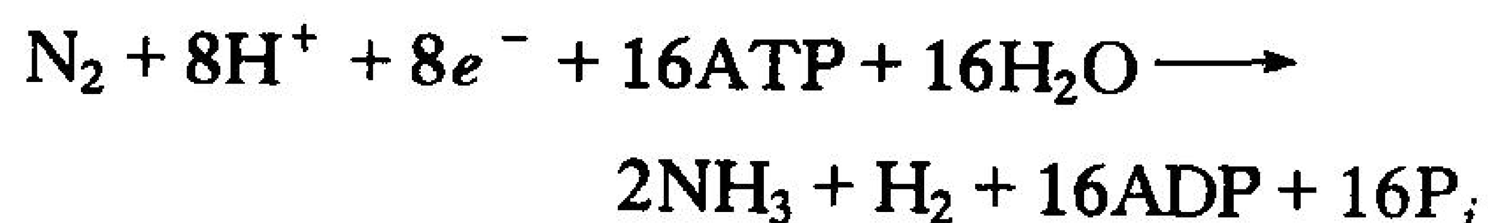


图 20-38　豌豆的根瘤菌图
（引自 Vu/Cabisco/Visuals Unlimited）

根瘤细菌属的固氮菌与豆科植物（属于豌豆家族的植物，包括蚕豆、三叶草和苜蓿；图 20-38）的根瘤细胞共生，在那儿它们将 N_2 转化为 NH_3。



$$N_2 + 8H^+ + 8e^- + 16ATP + 16H_2O \longrightarrow 2NH_3 + H_2 + 16ADP + 16P_i$$

生成的 NH_3 可以被谷氨酸脱氢酶（见节 20-2B）掺入谷氨酸，也可以被谷氨酰胺合成酶（见节 20-5A）掺入谷氨酰胺。这种固氮系统产生代谢上可以利用的氮比豆科植物所需要的更多，过量的氮被排入土壤中，使土壤肥沃。因此，农业上常常每隔几年在田里种植苜蓿，以便增加土壤中可利用氮的供应，用于以后种植其他农作物。

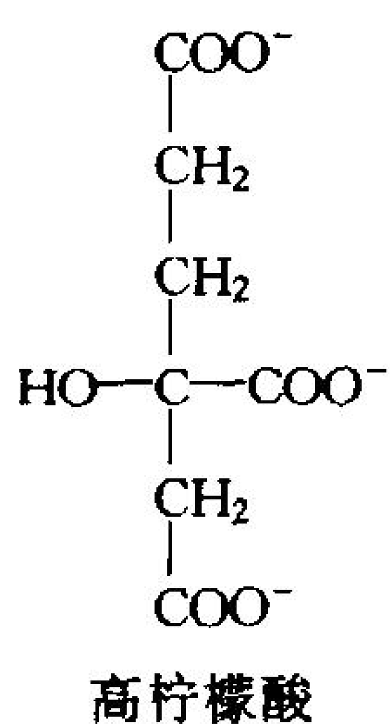
固氮酶含有几种新颖的氧化还原中心

催化 N_2 还原生成 NH_3 的**固氮酶**（nitrogenase）由两种蛋白质组成。

1）**铁蛋白**（Fe-protein），由相同亚基组成的约 64kDa 的二聚体，每个亚基含一个[4Fe-4S]簇

和二个 ATP 结合位点(图 20-39)。

659



2) **铁钼蛋白**(MoFe-protein),由 $\alpha_2\beta_2$ 亚基组成的约 220kDa 的蛋白质,含 Fe 和 Mo(图 20-40)。每个 αβ 二聚体包含两个结合的氧还中心:①**P-簇**(P-cluster)(图 20-41a),由一个[4Fe-4S]簇与一个[4Fe-3S]簇相连组成,这两个簇一起与 6 个 Cys 残基的硫原子,一个 Ser 侧链氧原子和一个主链氮原子配位;② **FeMo 辅助因子**(FeMo cofactor)(图 20-41b),由一个[4Fe-3S]和一个[Mo-3Fe-3S]簇组成,它们之间通过 3 个硫离子桥连。Mo 离子与 3 个硫离子、一个 His 氮原子和**高柠檬酸**(homocitrate)(见左面)的 2 个氧原子配位,高柠檬酸是铁钼辅助因子的必需组分。N_2 被认为结合在铁钼辅助因子的中央空穴中。



图 20-39 固氮菌 *Azotobacter vinelandii* 的固氮酶铁蛋白二聚体的X射线结构,从二重对称轴垂直于纸平面看

蛋白质用带状形式表示,螺旋以蓝色表示,β-折叠用红色表示,其余片段为绿色。[4Fe-4S]簇(中央上部)和 MoO_4^{2-}(中央右部)以球棒模型表示。(假定 MoO_4^{2-} 占据了磷酸结合位点。)(引自 Douglas Rees, California Institute of Technology)

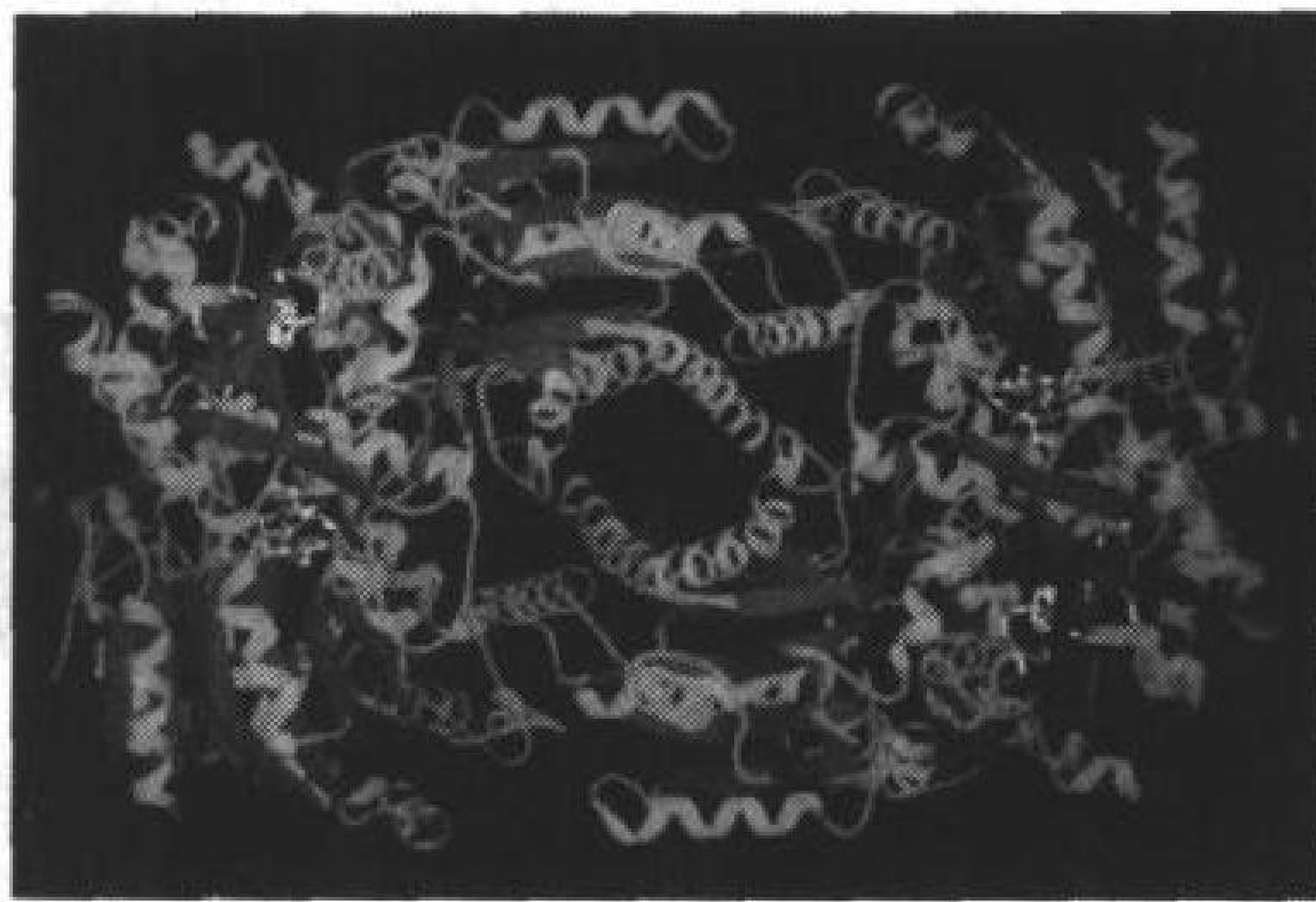
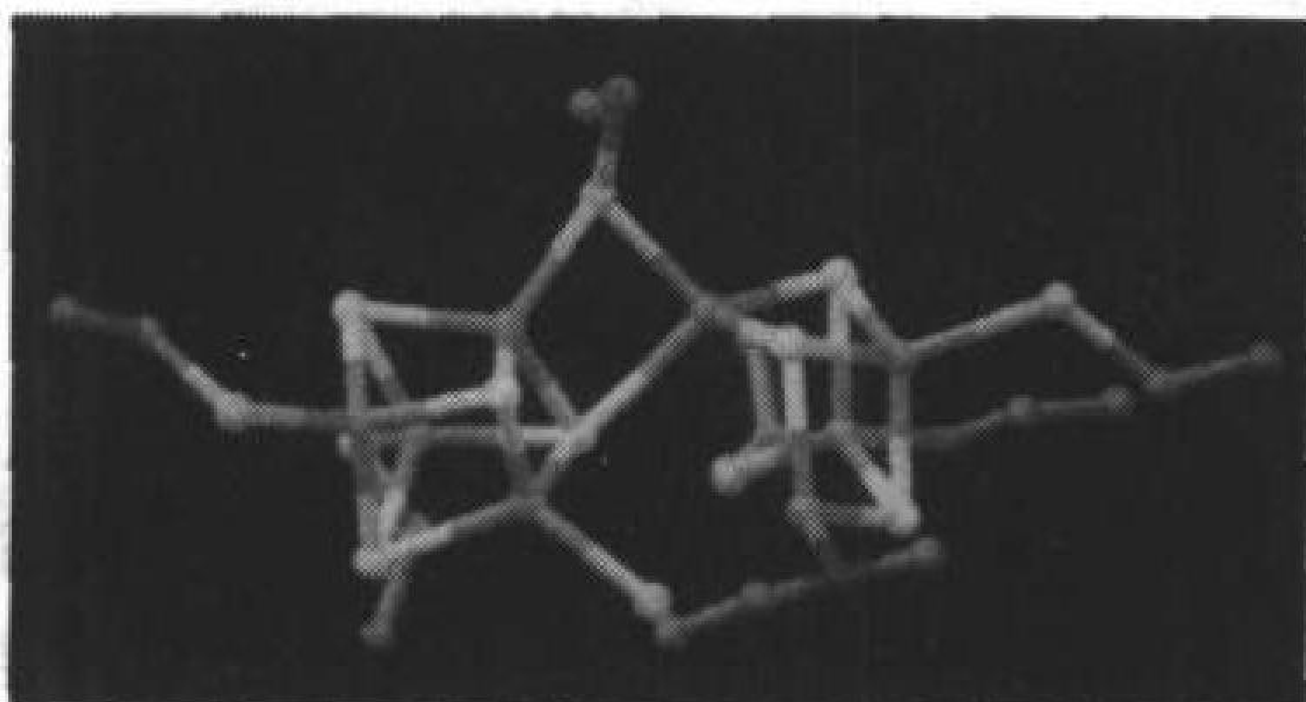
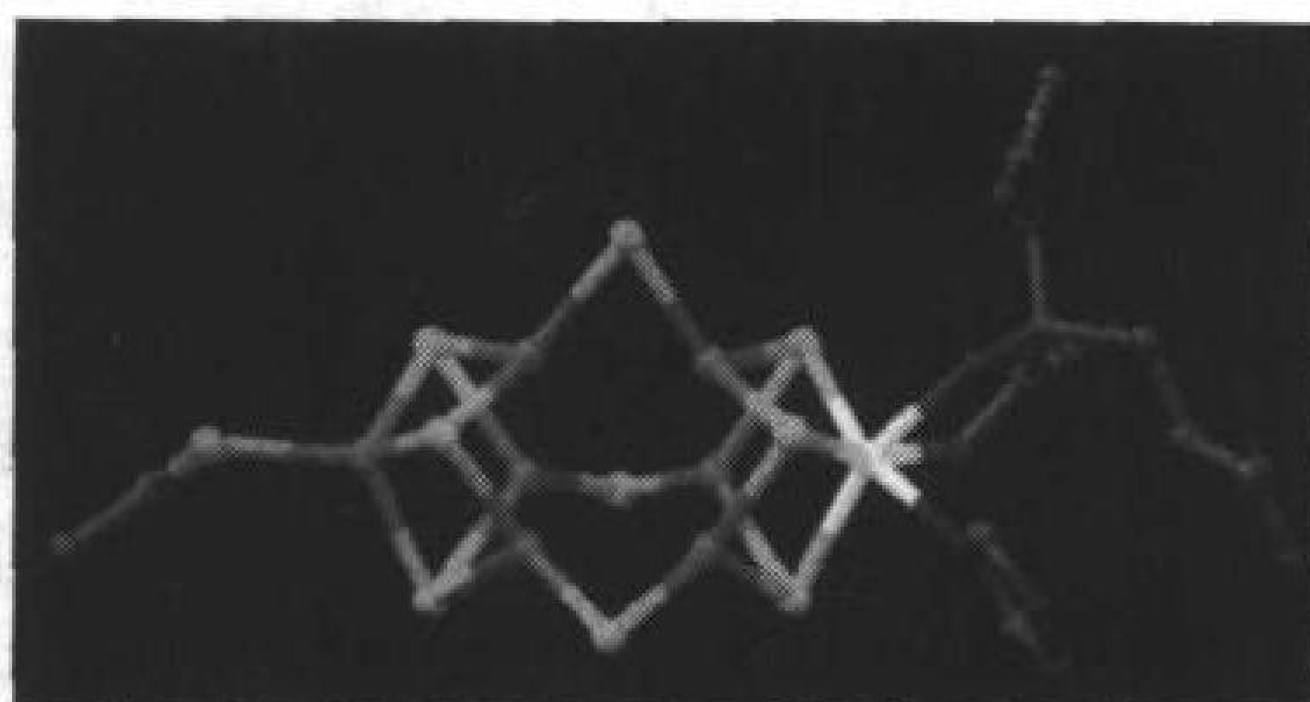


图 20-40 固氮菌 *A. vinelandii* 固氮酶铁钼蛋白 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体的X射线结构,沿分子二重对称轴向下看

蛋白质以带状形式表示,颜色同图 20-39,P-簇(左上部和右下部)和铁钼辅助因子(左下部和右上部)用球棒模型表示。(引自 Douglas Rees, California Institute of Technology)



(a)



(b)

图 20-41 固氮菌 *A. vinelandii* 固氮酶铁钼蛋白的辅基

(a)氧化态的 P-簇以及(b)铁钼辅因子。各原子的颜色为:C 绿色,N 蓝色,O 红色,硫离子黄色,Cys S 原子金色,Fe 棕色和 Mo 白色。(依据 an X-ray structure by Douglas Rees, California Institute of Technology)

N_2 的还原是消耗能量的

固氮酶催化的固氮作用除了需要 N_2 以外，还需要电子和 ATP。电子可以通过氧化或光合作用产生，这取决于不同的有机体。这些电子被转移给铁氧还蛋白，这是一个含[4Fe-4S]的电子载体，可将电子传递给固氮酶的铁蛋白，从而启动固氮过程(图 20-42)。当电子从铁蛋白传给铁钼蛋白时，两分子 ATP 与还原型铁蛋白结合，并被水解。ATP 水解被认为导致铁蛋白的构象改变，使其氧还电势从 −0.29 V 降至 −0.40 V，电子才能还原 N_2(反应 $N_2 + 6H^+ + 6e^- \rightleftharpoons 2NH_3$ 的 $E^{\circ\prime}$ 为 −0.34 V)。

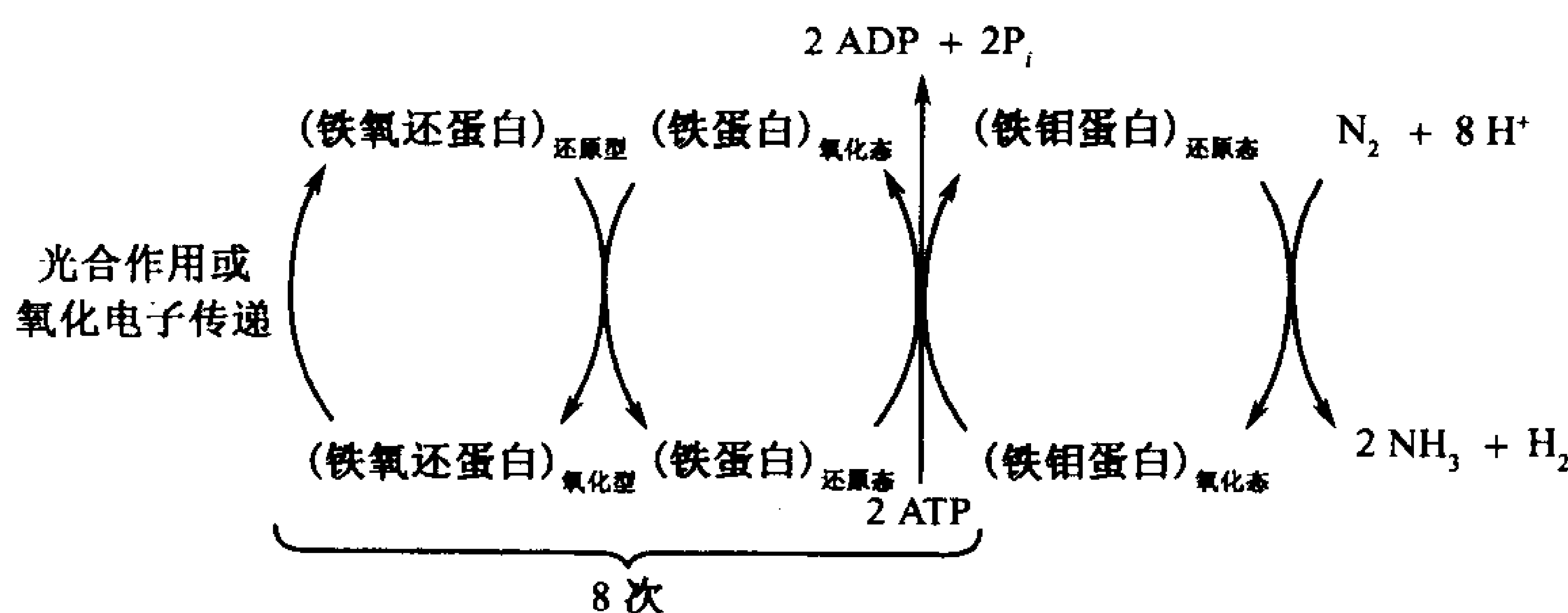
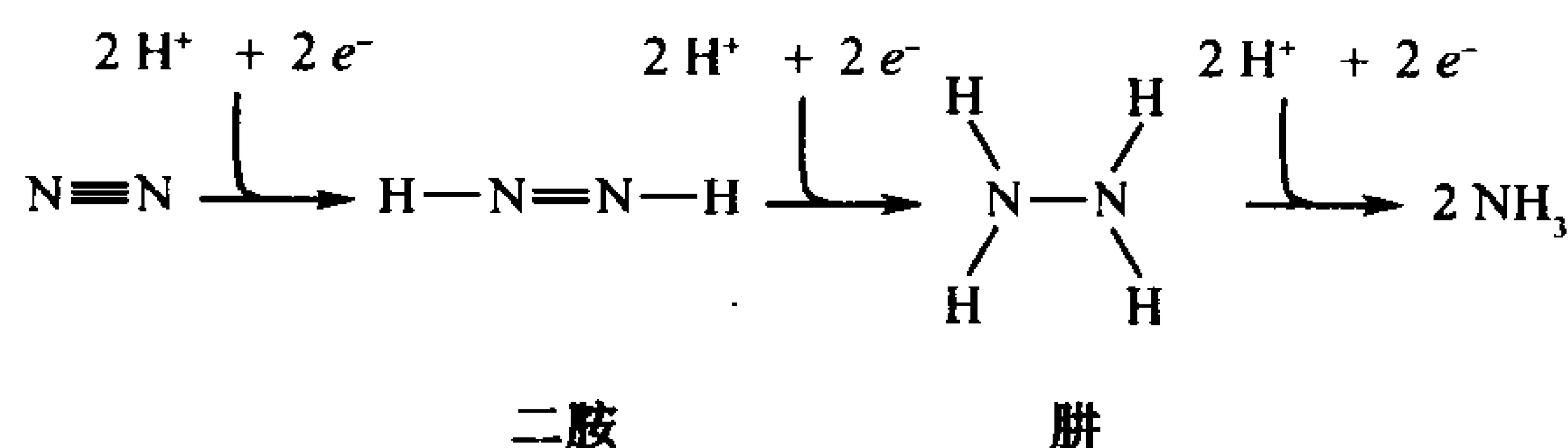
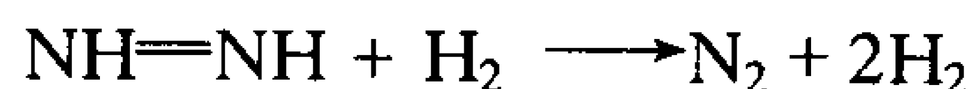


图 20-42　固氮酶催化 N_2 还原时的电子流向

实际上 N_2 的还原发生在铁钼蛋白中，包括三步分立的反应，每步反应涉及一对电子：



每固定一分子 N_2，需要发生 6 次电子转移，因此固定一分子 N_2 总共需要 12 分子 ATP。但是，固氮酶也将 H_2O 还原为 H_2，后者反过来与**二胺**(diimine)反应，重新生成 N_2。



$$NH{=}NH + H_2 \longrightarrow N_2 + 2H_2$$

当 ATP 水平较低和/或铁蛋白的还原作用处于停滞状态时，有利于这一无效循环。即使 ATP 十分丰富，这个循环也不会被抑制到每还原一分子 N_2 产生一分子 H_2 的程度以下，因此看来这个循环是固氮酶反应所需要的。每分子 N_2 的还原至少需要转移 8 个电子，水解 16 分子 ATP(生理状况下需 20～30 分子 ATP)。因此，固氮作用是一个十分耗能的过程。

虽然大气中的 N_2 是所有生命体最终的氮源，但是大多数植物不支持固氮菌的共生。因此它们必须依赖于一种"预先固定的"氮源，如硝酸盐或氨。这些营养素来自闪电放电(约占自然固 N_2 的 10%)、土壤中有机物的腐败或施加的肥料。基因工程的一项主要长期目标是在农业上诱导有用的非豆科植物固定它们自己所需的氮。这将使农民，尤其是发展中国家的农民，不必再购买化肥、或定期让其农田休耕(让豆科植物有机会生长)、或者用砍伐烧林的方法，这导致世界上热带森林的快速破坏。

小　结

1. 细胞内蛋白质被溶酶体蛋白质降解，或者被泛素化后由蛋白酶体作用而降解。
2. 一种氨基酸的降解，几乎总是从一个 PLP 辅助的转氨反应去除它的氨基开始。
3. 在尿素循环中，来自氨（谷氨酸氧化脱氨的产物）的一个氮原子和来自天冬氨酸的一个氮原子与 HCO^{3-} 结合生成尿素排出体外。这个过程的限速步骤是由氨甲酰磷酸合成酶催化的。
4. 20 种“标准”氨基酸被降解为可以生成葡萄糖、或酮体、或脂肪酸的化合物：丙酮酸、α-酮戊二酸、琥珀酰-CoA、延胡索酸、草酰乙酸、乙酰-CoA 或乙酰乙酸。
5. 非必需氨基酸是通过简单的代谢途径从丙酮酸、草酰乙酸、α-酮戊二酸和甘油-3-磷酸酸合成的。合成必需氨基酸的途径较为复杂，并且在不同有机体中也各不相同。
6. 氨基酸是许多生物分子的前体。血红素是从甘氨酸和乙酸合成的。许多激素和神经递质是通过组氨酸、谷氨酸、色氨酸和酪氨酸的脱羧和羟化合成的。精氨酸的 5 电子氧化作用产生生物活性的稳定自由基——氧化氮。
7. 细菌中的固氮作用，需要 8 个电子和至少 16 分子 ATP，是由固氮酶催化的，它是一个多亚基蛋白质，其氧还中心含有 Fe、S 和 Mo。

参考文献

Groll, M., Ditzel, L., Löwe, J., Stock, D., Bochtler, M., Batunik, H.D., and Huber, R., Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 Å resolution, *Nature* **386**, 463–471 (1997).

Hayashi, H., Pyridoxal enzymes: mechanistic diversity and uniformity, *J. Biochem.* **118**, 463–473 (1995).

Hershko, A. and Ciechanover, A., The ubiquitin system, *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 425–479 (1998).

Kim, J. and Rees, D.C., Nitrogenase and biological nitrogen fixation, *Biochemistry* **33**, 389–397 (1994).

Meijer, A.J., Lamers, W.H., and Chamuleau, R.A.F.M., Nitrogen metabolism and ornithine cycle function, *Physiol. Rev.* **70**, 701–748 (1990). [A review of the urea cycle and related topics.]

Peters, J.W., Stowell, M.H.B., Soltis, S.M., Finnegan, M.G., Johnson, M.K., and Rees, D.C., Redox-dependent structural changes in the nitrogenase P-cluster, *Biochemistry* **36**, 1181–1187 (1997).

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., and Frederickson, D.S. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (7th ed.), Chapters 27–38, McGraw-Hill (1995). [These chapters describe the normal and abnormal pathways of amino acid metabolism.]

Verhoef, P., Stampfer, M.J., and Rimm, E.B., Folate and coronary heart disease, *Curr. Opin. Lipidology* **9**, 17–22 (1998).

Warren, M.J., Jay, M., Hunt, D.M., Elder, G.H., and Röhl, S.C.G., The maddening business of King George III and porphyria, *Trends Biochem. Sci.* **21**, 229–234 (1996). [A fascinating account of retrospective medical detective work.]

Warren, M.J. and Scott, A.I., Tetrapyrrole assembly and modification into the ligands of biologically functional cofactors, *Trends Biochem. Sci.* **15**, 486–491 (1990).

关　键　词

泛素　ubiquitin
异肽键　isopeptide bond
N 末端规则　N-end rule
蛋白酶体　proteasome
转氨作用　transamination
脱氨作用　deamination
磷酸吡哆醛　PLP
尿素循环　urea cycle
高血氨症　hyperammonemia
生糖氨基酸　glucogenic amino acid
生酮氨基酸　ketogenic amino acid
四氢叶酸　THF
S-腺苷甲硫氨酸　SAM
生物蝶呤　biopterin
必需氨基酸　essential amino acid
非必需氨基酸　nonessential amino acid
腺苷酰化作用　adenylylation
尿苷酰化作用　uridylylation

通道转移　channeling
叶啉沉着症　porphyria
黄疸　jaundice
儿茶酚胺　catecholamine
固氮作用　mitrogen fixation

学习思考题

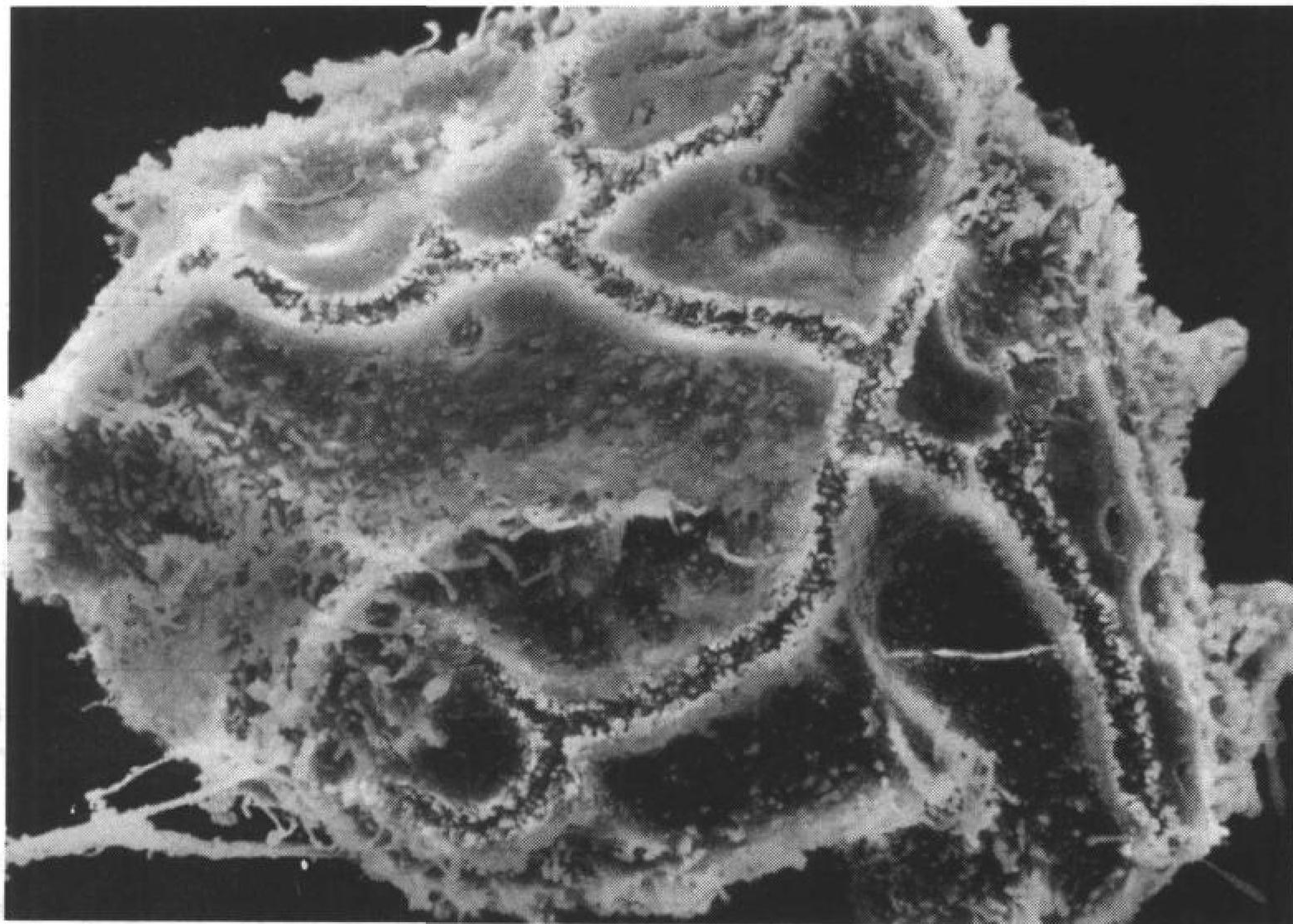
1. 描述依赖于泛素的蛋白质降解途径。
2. PLP 如何帮助氨基酸脱氨？
3. 总结尿素循环的反应步骤。
4. 描述氨基酸骨架的两种普遍的代谢命运。
5. 非必需氨基酸的代谢前体是什么？
6. 为什么固氮作用如此耗能？

练　习　题

1. 虽然蛋白质酶解是一个放能过程，但是由蛋白酶体进行的蛋白质降解仍需要 ATP，解释为什么。
2. 解释为什么尿素循环酶部分缺陷的症状可以通过低蛋白饮食来减轻。
3. 解释为什么高浓度的氨可以降低柠檬酸循环的速度。
4. 在异亮氨酸降解途径中(图 20-19)，画出将甲基巴豆酰 CoA 转化为乙酰 CoA 和丙酰 CoA 的反应。
5. 画出色氨酸降解途径(图 20-21)中，3-羟基犬尿氨酸裂解生成 3-羟基氨茴酸时形成的氨基酸-希夫碱，并标明哪个键将被切断。
6. 20 种“标准”氨基酸中，哪些是(a)纯生糖的(b)纯生酮的和(c)既生糖又生酮的？
7. 丙氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸是可以降解产生丙酮酸的氨基酸，如果其余 15 种氨基酸中也有可以裂解产生丙酮酸的，那么是哪些？
8. 大肠杆菌中尿苷酰去除酶的缺陷会产生什么代谢后果？
9. 许多被广泛使用的除草剂可以抑制芳香族氨基酸的合成。解释为什么这些化合物对附近的动物是安全的。
10. Kwashiorkor(恶性营养不良症)的症状之一是皮肤和头发的褪色，这是儿童因饮食中蛋白质缺少引起的疾病，解释这个症状的生化基础。

(南京大学　郑伟娟　译)

第 21 章　哺乳动物的燃料代谢：代谢的整体性及其调节



肝细胞中进行着一系列各种各样的代谢过程。那么，究竟具有特定活性的肝脏细胞和其他类型的细胞是如何协作以达到最高的代谢效率，并使机体适应外界的环境变化的？错误的调节又是如何导致疾病发生的？（P. M. Motta, T. Fujita, and M. Muto/Photo Researchers.）

---

1. 器官特异性
   - A. 脑
   - B. 肌肉
   - C. 脂肪组织
   - D. 肝脏
2. 器官之间的代谢途径
   - A. Cori 循环
   - B. 葡萄糖-丙氨酸循环
   - C. 葡萄糖转运蛋白
3. 激素作用的机制：信号转导
   - A. 燃料代谢的激素调节
   - B. 腺苷酸环化酶信号系统
   - C. 受体酪氨酸激酶
   - D. 磷酸肌醇途径
4. 燃料代谢失调
   - A. 饥饿
   - B. 糖尿病
   - C. 肥胖症

664

即使在最简单的原核细胞中，新陈代谢各过程也必须很好地协调起来。这样，一方面可以避免拮抗代谢途径的同时发生，另一方面也可以使机体能够对变化的外界环境，例如营养物质的可利用性，做出反应。同时，机体的代谢活动必须满足遗传上既定的生长、繁殖过程的需要。在多细胞有机体中，能量收支的协调比起单细胞有机体要复杂得多，因为前者还包括了各细胞间的协调作用。在动物与植物中，这一目标的实现被大大简化，由各组织分别完成。

在动物中，各组织的相互联系是由神经网络和激素作用来共同保证实现的。这样的调节系统不仅仅只是简单地将细胞"打开"和"关闭"，同时也诱发一系列特定的反应。对一给定调节信号反应的准确性是建立在细胞识别信号的能力以及协同信号和拮抗信号同时存在的基础上。

我们对哺乳动物碳水化合物、脂类及氨基酸代谢(节 14-20)的研究，如果没有在分子水平上探讨这些过程是如何协调作用的以及它们的功能失常如何导致疾病的，这样的研究是不完全的。在本章节中，我们总结了不同器官的特定代谢过程以及各器官间的联系途径。同时，我们也研究胞外激素影响胞内事件的机制，最后讨论哺乳动物燃料代谢失调的问题。

1. 器官特异性

到目前为止讨论的许多代谢途径为了生产 ATP 都必须进行代谢燃料的氧化。这些途径围绕着葡萄糖、脂肪酸和氨基酸的合成与降解，总结如图 21-1 所示。

1) **糖酵解**　葡萄糖的分解代谢开始于葡萄糖转换为两分子丙酮酸，同时净产两分子 ATP。
2) **糖异生**　哺乳动物可以由不同的前体，例如丙酮酸，经一系列反应合成葡萄糖，其中大部分反应是糖酵解途径的逆反应。
3) **糖原降解与合成**　由糖原磷酸化酶和糖原合酶催化的这两个相反过程受到激素调节的磷酸化和去磷酸化作用的反向调节。
4) **脂肪酸合成与降解**　脂肪酸通过 β 氧化过程降解成为乙酰 CoA(节 19-2)，乙酰 CoA 可转变为丙二酸单酰 CoA，所以也是脂肪酸合成的底物。
5) **柠檬酸循环**　柠檬酸循环(节 16-1)将乙酰 CoA 氧化成 CO_2 和 H_2O，同时伴随还原型辅酶的形成，后者的再氧化将推动 ATP 的合成。许多生糖氨基酸经柠檬酸循环被氧化是在其降解为它的中间产物(节 20-4)，中间产物转而降解成丙酮酸，再形成柠檬酸循环的惟一底物乙酰 CoA 后发生的。
6) **氧化磷酸化**　这个线粒体途径将糖酵解、β 氧化和柠檬酸循环产生 NADH 和 $FADH_2$ 的氧化过程与 ADP 磷酸化过程偶联起来(节 17-3)。
7) **氨基酸合成与降解**　多余的氨基酸降解成糖酵解和三羧酸循环的中间产物(节 20-4)，氨基经尿素合成过程(节 20-3)得到处理。非必需氨基酸经开始于普通代谢物的途径合成(节 20-5A)。

665

位于主要代谢途径交叉处的两个化合物是乙酰 CoA 和丙酮酸(图 21-1)。乙酰 CoA 是葡萄糖、脂肪酸和生酮氨基酸降解的共同产物。它的乙酰基可经柠檬酸循环和氧化磷酸化过程被氧化成 CO_2 和 H_2O，同时也可以用来合成酮体或脂肪酸。丙酮酸是糖酵解和生糖氨基酸降解的产物。一方面，它可经氧化脱羧过程生成乙酰 CoA，由此使其原子或者继续氧化，或者参与脂肪酸的生物合成。另一方面，丙酮酸也可以通过丙酮酸羧化酶羧化生成草酰乙酸，它既可以补充柠檬酸循环中间产物，也可以用于合成葡萄糖或特定的氨基酸。

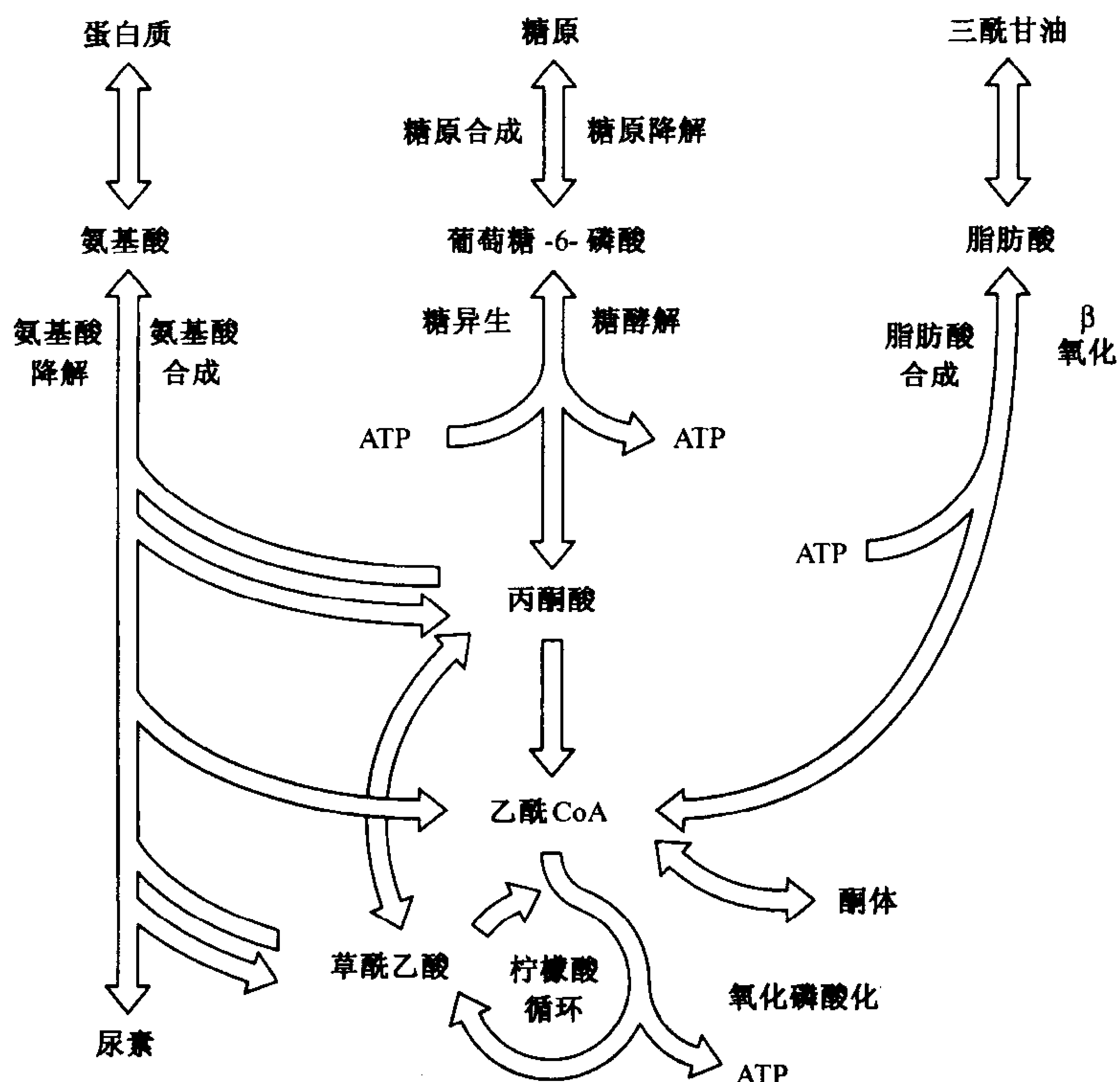


图 21-1 哺乳动物能量代谢的主要途径

蛋白质、糖原和三酰甘油可由一些单体物质合成,同时也可重新降解为单体物质,这些单体物质包括:氨基酸、葡萄糖-6-磷酸和脂肪酸。这些燃料的氧化产生代谢能——ATP。丙酮酸(葡萄糖和氨基酸降解的产物)和乙酰 CoA(葡萄糖、氨基酸和脂肪酸降解的产物)在哺乳动物燃料代谢中占据了中心位置。能够产生丙酮酸的化合物(例如:草酰乙酸)可用于进行糖异生;乙酰 CoA 可形成酮体但不能产生丙酮酸。以上所示的代谢途径并不是在所有的细胞中都出现,也并不是在一个细胞中同时进行。

*只有像肝脏那样的少数组织能够进行如图 21-1 所示的所有反应,而在一个指定的细胞内只有所有可能代谢反应中的一小部分反应是以有意义的速率发生的。*物质经由哪一系列反应取决于合适的酶催化剂的存在以及机体对反应产物的需求程度。

666

我们将讨论 4 种哺乳动物器官:脑、肌肉、脂肪组织和肝脏的代谢。代谢物按照明确清晰的途径在这些器官之间流动,在这些途径中流向会随动物营养状态的改变而发生变化(图 21-2)。例如:进食后,人体所需的葡萄糖、氨基酸和脂肪酸可直接由小肠提供。一段时间后,当这些燃料被耗尽,肝脏便开始为其他组织提供葡萄糖和酮体,同时,脂肪组织为它们提供脂肪酸。所有这些器官通过血液连接在一起。

A. 脑

脑组织具有明显的高呼吸速率。虽然人脑仅占成人总体量的 2%,但它消耗的氧气却占人体总耗氧量的 20%左右。脑产生的大部分能量用来驱动质膜 Na^+-K^+-ATPase(节 10-4C),维持神经冲动传导所需的膜电位。

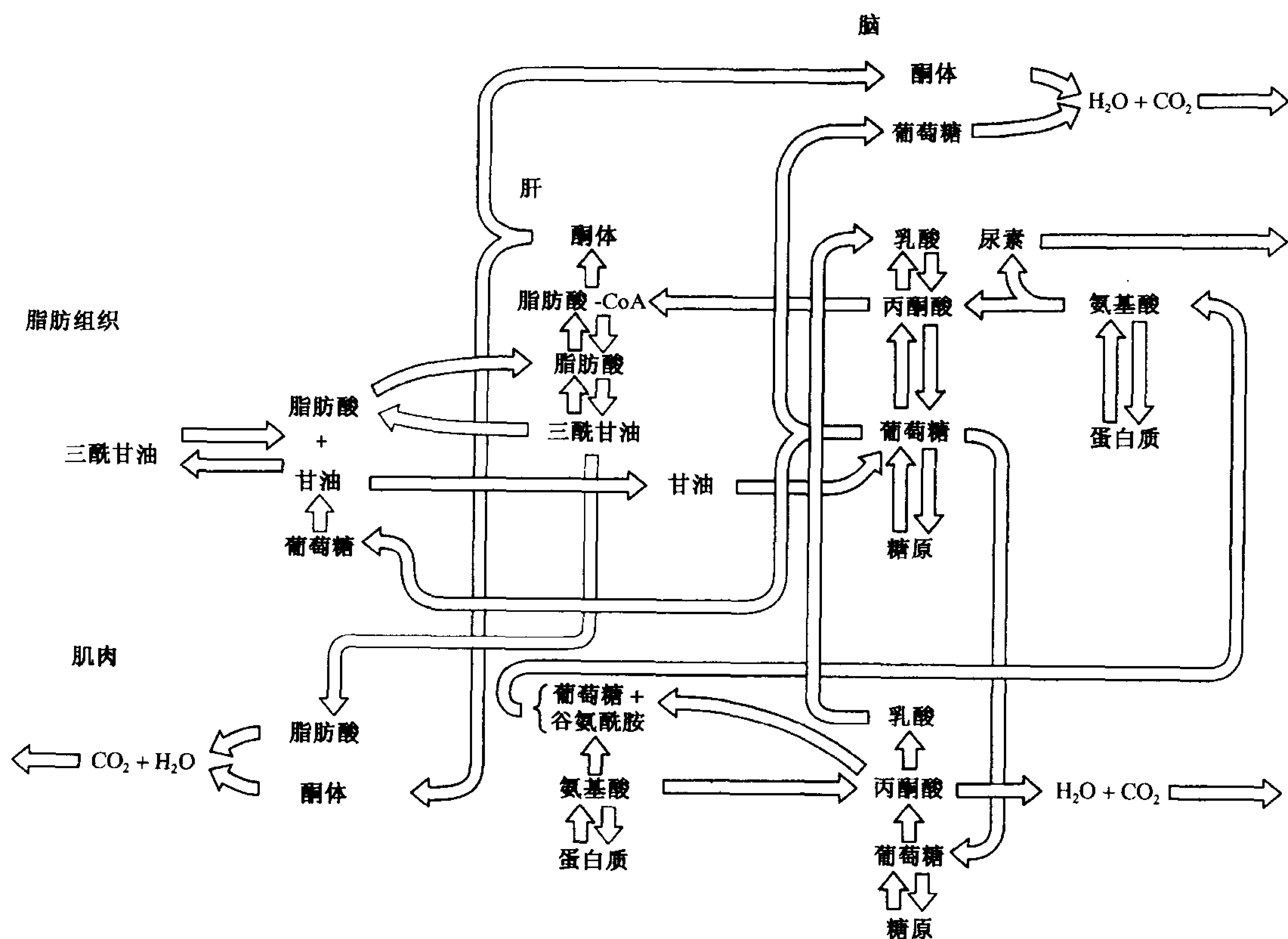


图 21-2　代谢的秘诀:在脑、脂肪组织、肌肉和肝脏中的代谢相互关系
红箭头表示机体在良好状态下进行的主要代谢途径。

在通常条件下,葡萄糖是脑的基本燃料(虽然当机体持续处于饥饿状态时,脑逐渐转向以酮体为燃料;节 21-4A)。由于脑细胞能够储存的糖原量很少,它们需要血液中葡萄糖的稳定供给。当血糖浓度低于正常值(约 5mmol·L^{-1})一半时将导致脑功能失调;若浓度更低,将导致昏迷,不可逆转的损伤,而最终死亡。　667

B. 肌肉

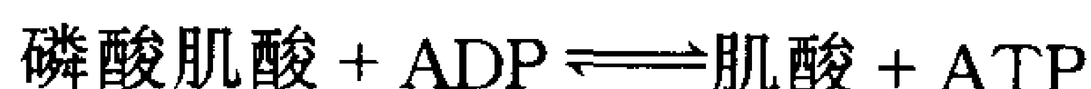
肌肉的主要燃料是葡萄糖(来自糖原)、脂肪酸和酮体。在安静状态下,营养充足的肌肉合成糖原贮存占肌肉质量 1%～2%。虽然三酰甘油是一种更有效的能源储存形式(节 9-1B),但合成糖原的代谢付出是值得的,因为糖原比脂肪代谢更快,糖原能在厌氧条件下代谢,而脂肪酸不能。

在肌肉中,糖原以葡萄糖-6-磷酸(G6P)的形式进入糖酵解。但肌肉不能输出葡萄糖,因为它

缺少葡萄糖-6-磷酸酶。虽然肌肉可以由葡萄糖合成糖原，但它本身并不参与糖异生过程，因为它缺少该过程所需的酶。因此，肌肉的碳水化合物的代谢仅为其自身服务。

在高度紧张情况下肌肉的收缩是厌氧的

肌肉的收缩是由 ATP 水解(节 7-3C)驱动的，因此需要一个好氧或者是厌氧的 ATP 再生系统。呼吸作用(柠檬酸循环和氧化磷酸化)是机体所需 ATP 的主要来源。骨骼肌在安静状态下大约消耗机体总耗氧量的 30%。为了适应繁重的工作负担，肌肉的呼吸速率可以提高 25 倍多。同时，其 ATP 水解速率增加的幅度更大。ATP 的再生首先是由磷酸肌酸反应完成的(节 13-2C)：


磷酸肌酸 + ADP ⇌ 肌酸 + ATP

(安静肌肉中磷酸肌酸可通过它的逆反应重新合成)。然而，当肌肉处于其最大负荷状态时(例如短跑过程)，它所供给的磷酸肌酸仅够维持约 4s 的时间，因此它必须转向由 G6P 的酵解来生产 ATP。该过程的最大 ATP 产量大大超过柠檬酸循环和氧化磷酸化过程产生的能量，因此，大量 G6P 在厌氧条件下被降解成乳酸(节 14-3A)。正如我们在节 21-2A 中看到的那样，乳酸的产生大大缓解了肌肉的呼吸负担。通常在 20s 的最大负担后，肌肉出现疲劳，肌肉疲劳并不是因为肌肉糖原已被消耗殆尽引起的，而是因为乳酸浓度上升导致胞质 pH 值下降引起的(节 14-3A)。这种现象可以看成是机体的一种适应现象，它可以防止肌肉细胞因其 ATP 的消耗殆尽而走上自杀的道路。

668

心脏主要进行有氧代谢

心脏是一个连续而非间歇运动的肌肉器官，因此，心肌完全依赖于有氧代谢，含有大量的线粒体，线粒体占据了 40%的胞质空间。心脏可以代谢脂肪酸、酮体、葡萄糖、丙酮酸和乳酸。脂肪酸是心脏安静时选择的燃料，但在进行重的工作时，心脏会大大增加葡萄糖的消耗，这些葡萄糖大多来源于相对有限的糖原库。

C. 脂肪组织

脂肪组织的功能是储存和释放脂肪酸用作燃料。脂肪组织广泛分布于机体各处，但主要分布在皮肤下、腹腔内和骨骼肌里。70kg 的正常男人含有大约 15kg 的脂肪，这一数量相当于 59 000kJ(141 000cal)的能量，它足够维持机体生存 3 个月。

脂肪组织从循环血液的脂蛋白(节 19-1B)中获取大部分脂肪酸用于储存。脂肪酸通过形成脂酰 CoA 被激活，然后与甘油-3-磷酸酯化形成用于储存的三酰甘油。甘油-3-磷酸来源于二羟丙酮磷酸的还原，而后者是由葡萄糖经糖酵解生成的。

在代谢需要时，脂肪细胞在激素敏感性脂肪酶(节 19-5)的作用下将三酰甘油水解成脂肪酸和甘油。如果机体中的甘油-3-磷酸充足，许多形成的脂肪酸将被重新酯化成三酰甘油。如果甘油-3-磷酸供给不足，脂肪酸被释放到血液中。因此，*脂肪酸的代谢部分取决于葡萄糖摄入的速率，因为葡萄糖是甘油-3-磷酸的前体物质*。代谢需求的信号是直接通过葡萄糖浓度下降或激素刺激给出的。

D. 肝脏

肝脏是机体的中心代谢集散地,它使循环燃料维持在适当水平供脑、肌肉和其他组织使用。肝脏是惟一能适合执行这个任务的器官,因为除了脂肪酸外,所有小肠吸收的营养物质均释放入门静脉,然后直接进入肝脏中。

葡糖激酶将血液中的葡萄糖转换为葡萄糖-6-磷酸

肝脏的主要功能之一是作为血液中葡萄糖的"缓冲液",它是通过对激素和葡萄糖自身浓度的应答来调节葡萄糖的吸收和释放的。机体摄入含糖的饮食后,当血液中葡萄糖浓度大约达到 6mmol·L^{-1}时,肝脏摄入葡萄糖,并转化为 G6P,该反应由**葡糖激酶**(glucokinase,一种肝脏己糖激酶的同工酶)催化。在大多数细胞中,己糖激酶遵循 Michaelis-Menten 动力学规律,具有高的葡萄糖亲和性(K_M<0.1mmol·L^{-1}),受反应产物的抑制。相比之下,葡糖激酶对葡萄糖的亲和性要低得多(在约 5mmol·L^{-1}时达到最大反应速度的一半),其反应的动力学曲线呈现 S 型。因此,*葡糖激酶活性随着血糖浓度(高于正常生理范围)的升高而快速增加*(图 21-3),而且葡糖激酶不受生理浓度 G6P 的抑制。因此血糖浓度越高,肝脏将葡萄糖转化为 G6P 的速度越快。当血糖浓度低时,肝脏不与其他组织竞争可利用的葡萄糖;反之,当血糖浓度高时,这些组织所需葡萄糖得到满足时,肝脏以与血糖浓度大致成比例的速度摄入多余的葡萄糖。

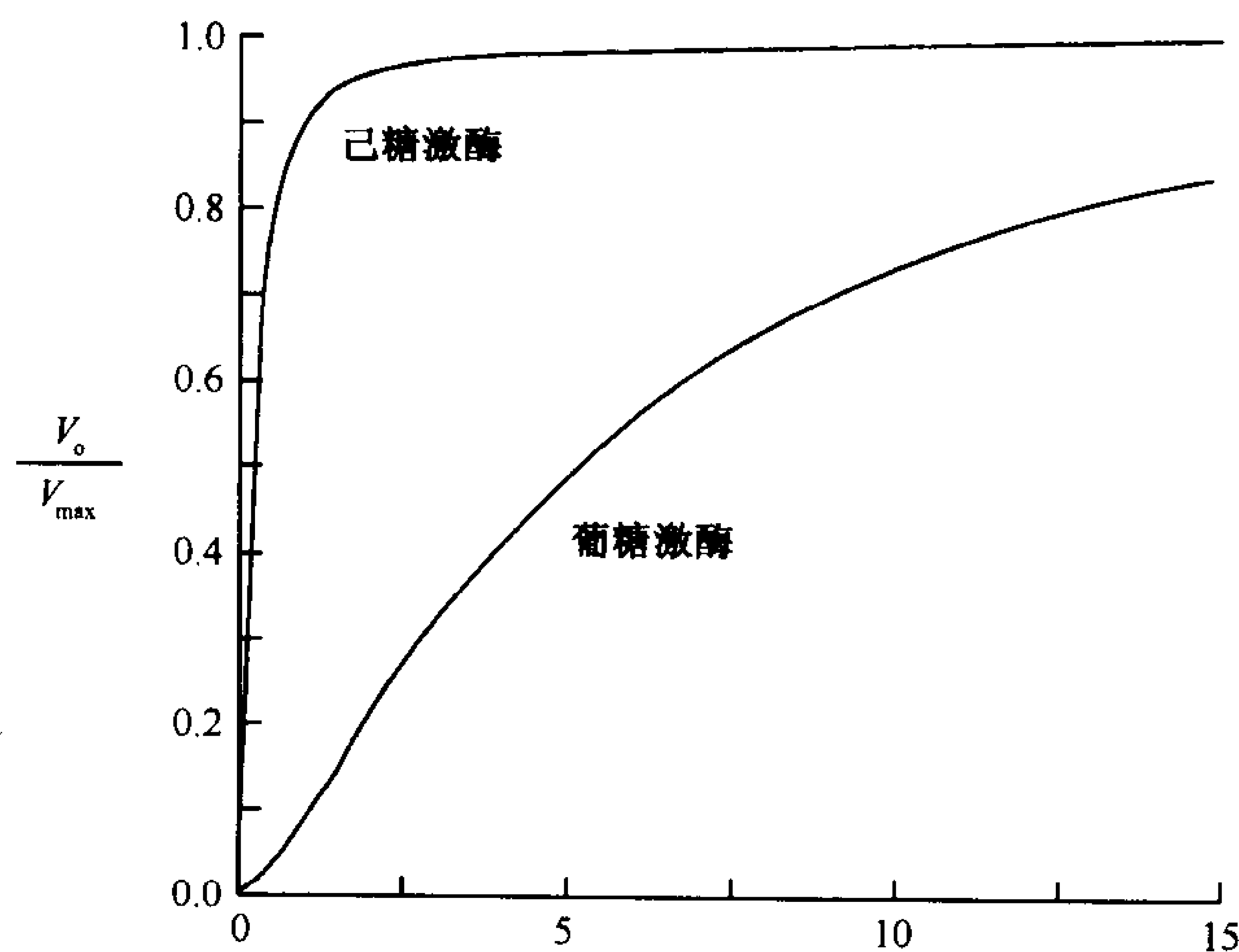


图 21-3　在生理浓度范围内己糖激酶和葡糖激酶的相对酶活
葡糖激酶对葡萄糖的亲和力(K_M≈5 mmol/L)比己糖激酶(K_M≈0.1 mmol·L^{-1})低得多,而且随葡萄糖浓度变化表现出 S 型曲线而不是双曲线。[葡糖激酶曲线是由 Hill 方程获得(Eq.7-4),其中 K = 10 mmol·L^{-1}, n = 1.5。数据来自于 Cardenas, M.L., Rabajille, E, and Niemeyer, H., Eur.J. Biochem. 145, 163~171 (1984)]

葡糖激酶是一种单体酶,因而它 S 型的动力学行为有些令人不解(别构相互作用的模型无法解释单体蛋白的协同效应行为,见节 7-2E),然而,葡糖激酶受代谢调控。Emile Van Schaftingen 已从大鼠肝脏中分离到一种**葡糖激酶调节蛋白**(glucokinase regulatory protein),它在糖酵解中间

产物果糖-6-磷酸(F6P)存在下是一种葡糖激酶的竞争性抑制剂。由于在葡糖异构酶的作用下肝脏细胞中的 F6P 和葡糖激酶产物 G6P 处于平衡状态,所以实际上葡糖激酶受到其自身产物抑制。果糖-1-磷酸(F1P)是果糖在肝脏中的代谢中间产物(节 14-5A),可消除这种抑制。因为在一般情况下,可利用的果糖仅仅来源于日常饮食,因而果糖可能是一个触发肝脏吸收饮食中葡萄糖的信号。

葡萄糖-6-磷酸处于糖代谢的交叉路口

G6P 在肝脏中有几条可供选择的命运,这取决于对葡萄糖的需求(图 21-4)。

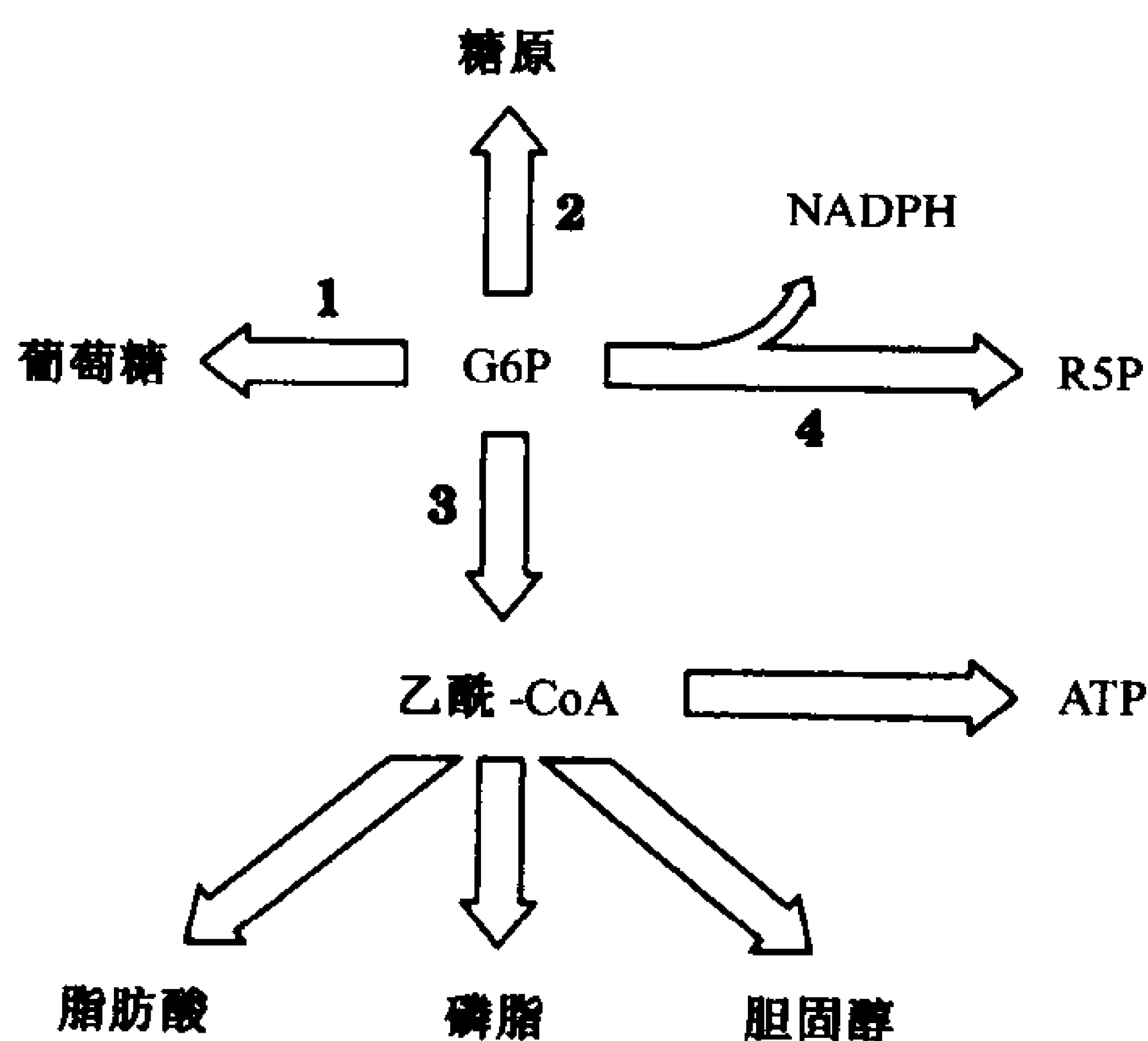


图 21-4 肝脏中葡萄糖-6-磷酸的代谢命运
G6P 可以(1)转换成葡萄糖运出肝脏;(2)转换成糖原储存在肝脏中。来自于 G6P 降解的乙酰-CoA 可以(3)作为脂肪生物合成的起始物质,也可以通过呼吸作用用来产生 ATP。G6P 也可以经由磷酸戊糖途径(4)用于提供 NADPH。

1) 在葡萄糖-6-磷酸酶的作用下,G6P 可以转化为葡萄糖,通过血液循环运送至外周器官。这一过程只有当血糖浓度降至约 5 $mmol·L^{-1}$以下时才会发生。当机体处于运动或饥饿状态时,低的血糖浓度会促使胰腺分泌胰高血糖素,肝脏细胞表面的胰高血糖素受体通过激活腺苷酸环化酶来响应胰高血糖素,结果胞内 cAMP 浓度上升触发糖原降解(节 15-3)。
2) 当机体对葡萄糖需求量低时,G6P 可转化为糖原(节 15-2)。
3) 经糖酵解和丙酮酸脱氢酶的作用,G6P 可转化为乙酰 CoA。来自于葡萄糖的乙酰 CoA,如果不通过柠檬酸循环和氧化磷酸化产生 ATP 的话,则可以用于合成脂肪酸(节 19-4)、磷脂(节 19-6)和胆固醇(节 19-17A)。
4) G6P 可以经磷酸戊糖途径(节 14-6)降解生成脂肪酸和其他化合物合成所需要的 NADPH。

肝脏可以合成或降解三酰甘油

脂肪酸在肝脏中也有几种不同的代谢命运。当机体对代谢燃料需求高时,脂肪酸可降解为乙酰 CoA,随后以酮体的形式运送至外周组织。肝脏本身并不能以酮体为燃料,因为肝细胞缺少将酮体转换成乙酰 CoA 的 3-酮酰 CoA 转移酶(节 19-3)。因此,当机体处于高代谢需求状态时,是脂肪酸而不是葡萄糖或酮体成为肝脏中乙酰 CoA 的主要来源。肝脏通过柠檬酸循环和氧化磷酸化从乙酰 CoA 获得它所需的 ATP。

当机体对代谢燃料需求低时,脂肪酸整合到三酰甘油中,三酰甘油以 VLDL 的形式进入血液循环,从而被脂肪组织摄入(节 19-6)。在这样的情况下,肝脏中合成的脂肪酸并不氧化成乙酰 CoA,因为脂肪酸的合成(在胞质中)部位与其氧化部位(在线粒体中)是分开的。

氨基酸是代谢燃料

肝脏可将氨基酸降解成各种各样的代谢中间产物,它们或者被完全氧化成 CO_2 和 H_2O,或者被转化为葡萄糖和酮体(节 20-4)。机体进食后,当血液中氨基酸浓度相对较高时,氨基酸的氧化可以立即提供很大一部分代谢能量;反之,当饥饿时,其他燃料缺乏,由氨基酸可以生成糖,而大部分氨基酸来自于肌肉蛋白降解的丙氨酸和谷氨酰胺。因此,蛋白质除了结构与功能上的作用外,它也是一种重要的燃料库。

670

2. 器官之间的代谢途径

肝脏能为其他组织提供葡萄糖或酮体,脂肪细胞能为其他组织提供脂肪酸。当然,这都依赖于机体中的循环系统,它可以在组织间传送代谢燃料、中间产物和废物。同时,一些重要的代谢途径是由发生在许多组织中的反应构成的。在本节中,我们将探讨两条了解得很清楚的器官之间的代谢途径,以及调节葡萄糖进出细胞通路的转运体的性质。

A. Cori 循环

驱动肌肉收缩的 ATP 或者来源于氧化磷酸化过程(在富含线粒体的慢伸缩肌肉纤维中,框 14-2),或者来源于葡萄糖转化为乳酸的快速分解代谢过程(在快速伸缩的肌肉纤维中)。但当 ATP 的需求量超过其氧化磷酸化过程的供给量时,慢伸缩肌肉纤维也会产生乳酸。乳酸经血液循环被运输到肝脏,在那儿,它被乳酸脱氢酶重新转化为丙酮酸,并经糖异生作用进一步转化为葡萄糖。因此,这一循环通过流动的血液将肝脏和肌肉联系起来,为了纪念其发现者 Cori 和 Getty Cori,我们称该循环为 **Cori 循环**(图 21-5)。

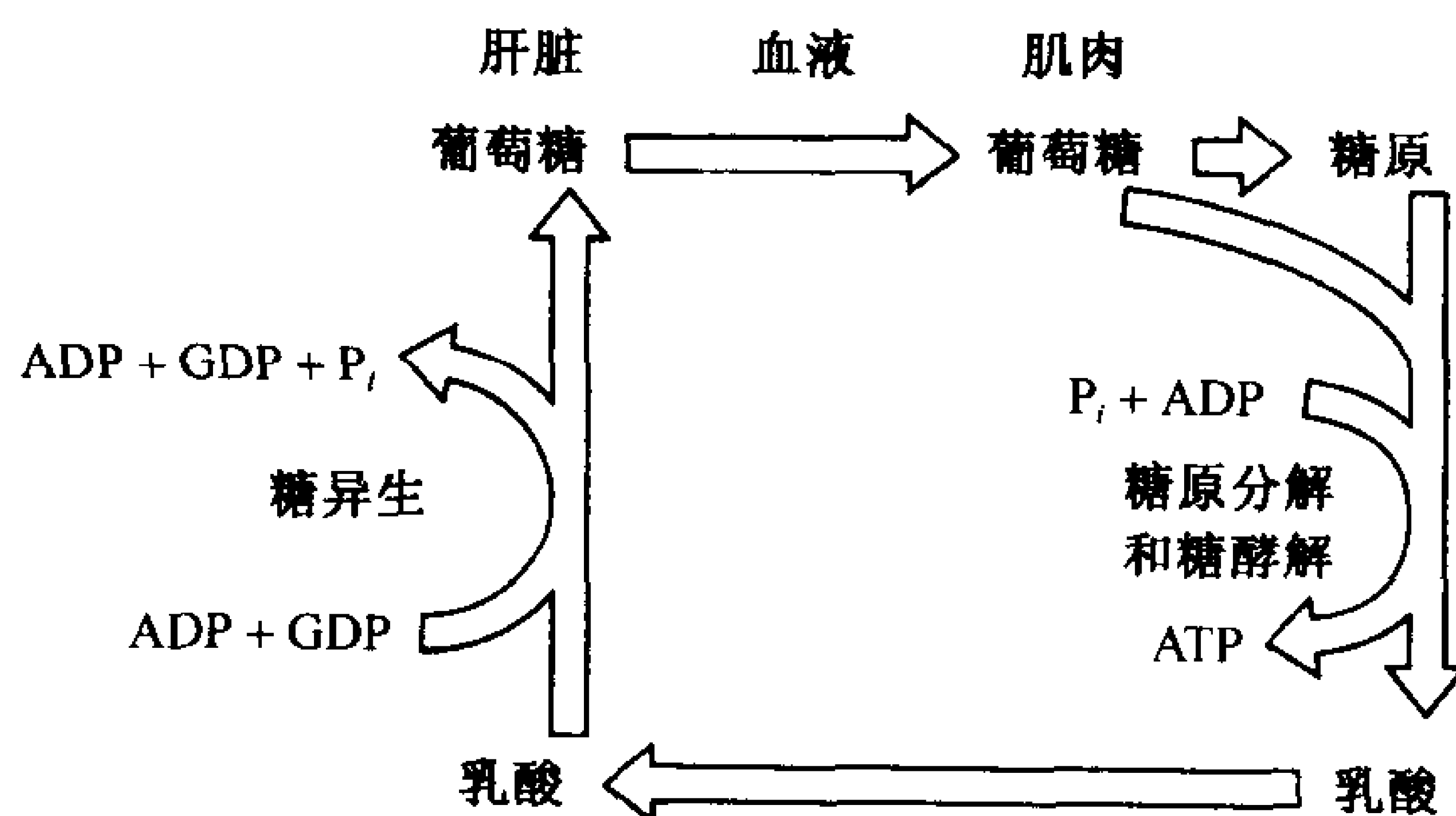


图 21-5　Cori 循环

肌肉经糖酵解过程产生的乳酸经血液循环运送至肝脏,并在肝脏中经糖异生作用转换为葡萄糖。随后,血流可重新将葡萄糖运送回肌肉去,在那儿,它可以以糖原的形式储存起来。

如果在单个细胞中发生上述过程,消耗 ATP 的糖酵解/糖异生是一种无效循环。但在这种情况下,循环的两个部分是分别在不同的器官中进行的。肝脏中的 ATP 用于将肌肉产生的乳酸重新合成葡萄糖,合成的葡萄糖再返回肌肉,以糖原的形式储存,或立即分解,为肌肉收缩提供 ATP。

Cori 循环中消耗的 ATP 可由氧化磷酸化重新生成。在激烈运动后,机体至少需要 30min 使氧消耗速率降至其安静时的水平。这些增加的氧气消耗是在补偿糖异生过程中因 ATP 需求所

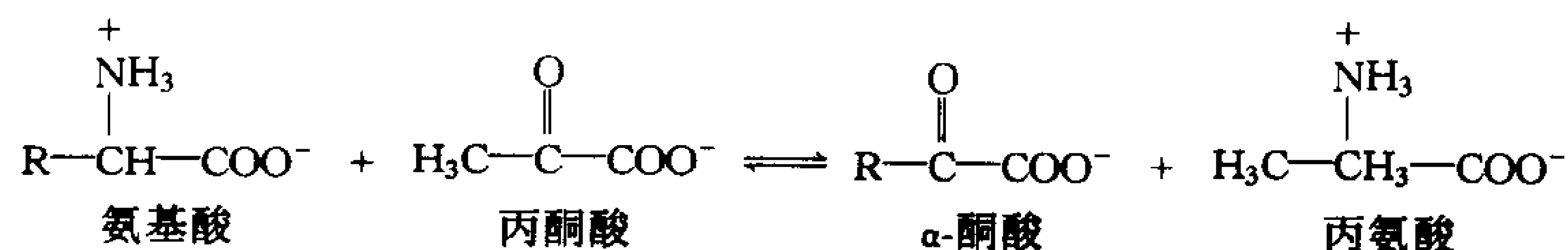
欠的**氧债**(oxygen debt)。

B. 葡萄糖－丙氨酸循环

在一个与 Cori 循环类似的代谢途径中，血液将肌肉中的丙氨酸而不是乳酸运送到肝脏。在

671

肌肉中，特定的氨基转移酶用 α-酮酸而不是 α-酮戊二酸和草酰乙酸作为底物(节 20-2A)。



反应产物丙氨酸被释放入血液中，运送至肝脏，并经转氨作用重新转化为丙酮酸。丙酮酸是糖异生的底物，而生成的葡萄糖可以重新返回肌肉，经糖酵解过程降解。这就是**葡萄糖-丙氨酸循环**(glucose-alanine cyde, 图 21-6)。丙氨酸携带的氨基最终转化为氨或天冬氨酸用于尿素的生物合成(只发生在肝脏中)。因此，*葡萄糖-丙氨酸循环是一种将氮由肌肉转运到肝脏的机制*。

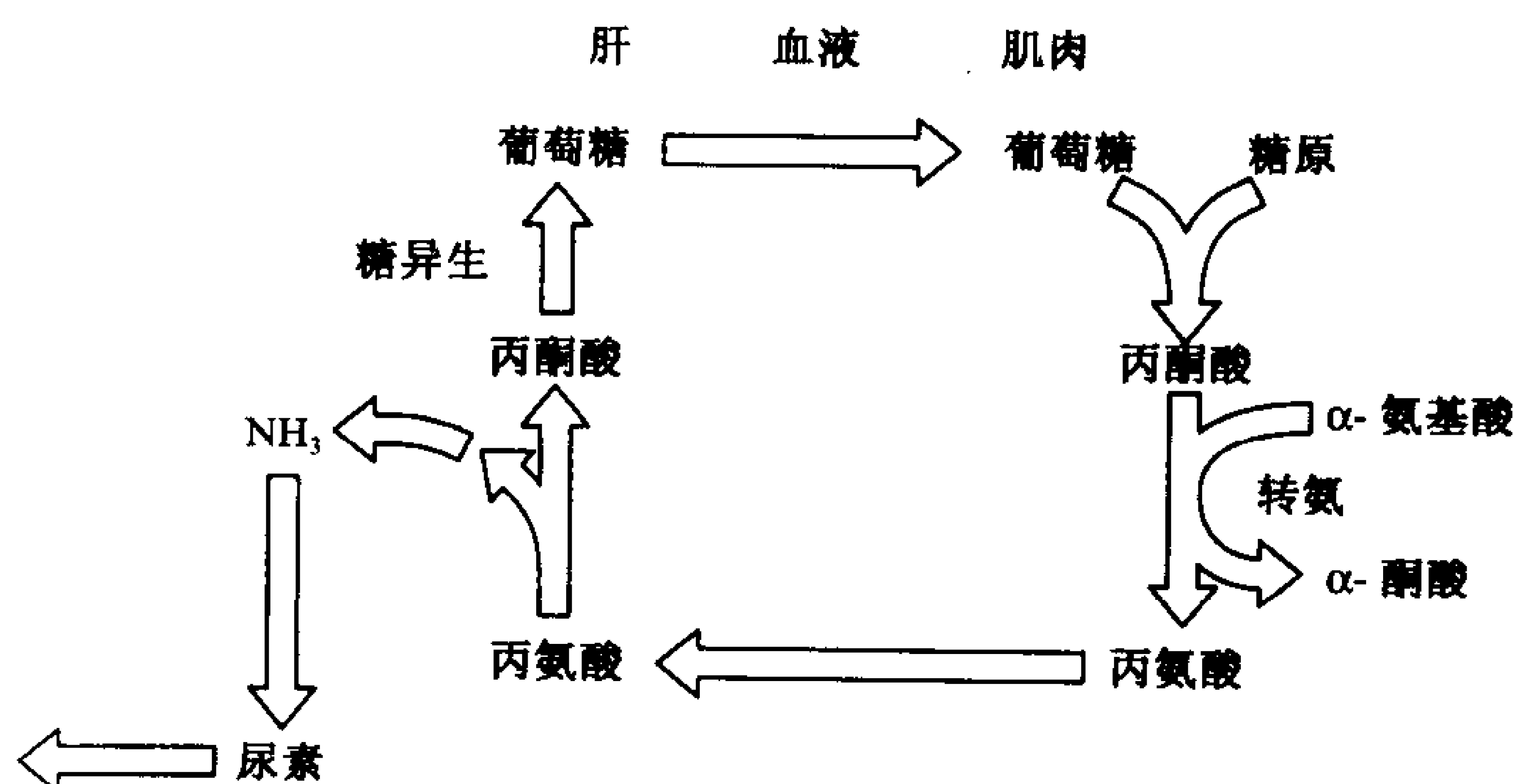


图 21-6 葡萄糖-丙氨酸循环

肌肉糖酵解产生的丙酮酸是肌肉氨基转移酶的氨基受体。产生的丙氨酸经血流运输至肝脏，并重新经脱氨基作用转换为丙酮酸(它的氨基基团经由尿素的合成过程得到处理)。丙酮酸是糖异生的一种底物，它可经糖异生过程转化为葡萄糖，且由血流携带重新返回肌肉中去。

机体在禁食期，肝脏经该途径合成的葡萄糖也可被其他组织利用，这就破坏了该循环。由于丙酮酸来源于肌肉蛋白的降解，尽管肌肉不能进行糖异生，但它仍可为其他组织提供葡萄糖。

C. 葡萄糖转运蛋白

组织间代谢产物的运输首先需要这些物质进出细胞的运输机制，例如：处于离子状态的氨基酸通过一些底物特异性相对宽的几个载体系统运输。同样的，葡萄糖通过一些蛋白载体进入细胞。我们已对红细胞的葡萄糖被动转运蛋白进行了研究(节 10-4B)，该转运蛋白也称为 **GLUT1**，存在于包括脑、肌肉和脂肪组织在内的许多组织中，但它在肝脏中的表达水平却较低。其他 5 种相关的葡萄糖转运蛋白：**GLUT2**、**GLUT3**、**GLUT4**、**GLUT5** 和 **GLUT7** 的表达具有组织特异性。

GLUT2 主要存在于肝脏和胰腺 β 细胞中。它对葡萄糖的 K_M 值较高(约 60mmol/L)，这使得进出该细胞的葡萄糖流量与胞外的葡萄糖浓度基本呈线性关系。换句话说，GLUT2 既不会

被葡萄糖饱和,也不会限制葡萄糖转运的速度。GLUT2 缺陷病症类似于 I 型糖原储存症(框 15-2)。

GLUT3 在脑和神经组织中表达,它们对葡萄糖的需求量高,可能是有 GLUT1 参与使葡萄糖的摄入达到最大。

GLUT4 是一种对胰岛素敏感的葡萄糖转运蛋白,仅出现在肌肉和脂肪组织中。胰岛素通过增加 GLUT4 的 V_{max}增加其活性。V_{max}的增加会受到转运蛋白内在活性提高的影响,但对 GLUT4 而言,V_{max}的提高是通过质膜上的其他转运蛋白实现的(图 21-7)。在缺乏胰岛素的条件下,GLUT4 位于胞内小泡中,胰岛素促使 GLUT4 转移到质膜上。由于对葡萄糖的 K_M 值(2～5mmol·L^{-1})相对较低,含有 GLUT4 的细胞将快速地从血液中摄入葡萄糖。反之,一旦胰岛素停止作用,葡萄糖转运蛋白将通过胞吞作用逐渐被隔离。 672

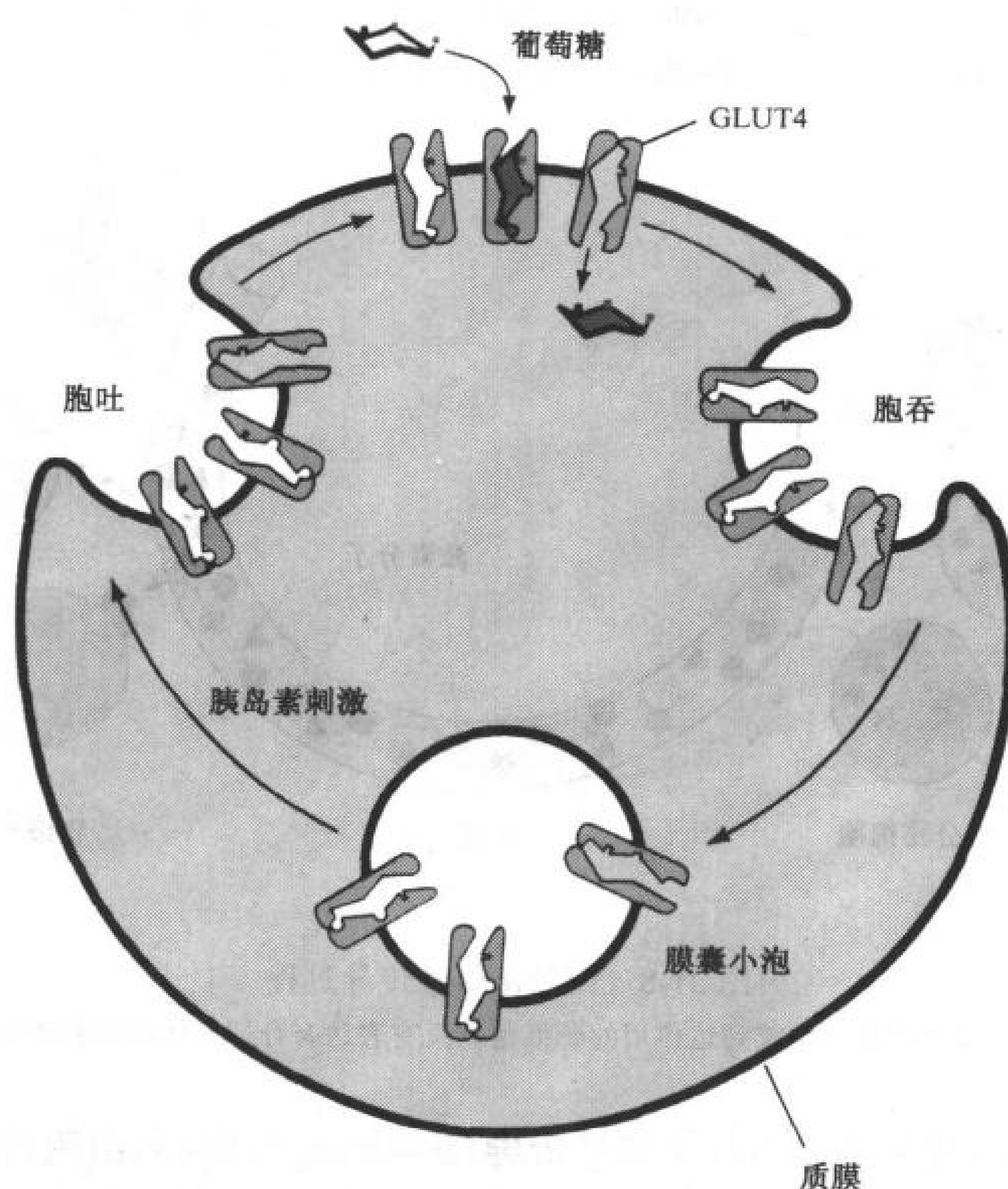


图 21-7　GLUT4 的活性

肌肉与脂肪细胞摄取葡萄糖的过程受胰岛素激活的含 CLUT4(左)的膜囊小泡的胞吐作用的影响。一旦胰岛素的刺激作用消失,该过程通过胞吞作用得到反转。

GLUT5 主要出现在小肠中。葡萄糖由小肠腔转运到黏膜细胞主要借助于非相关的 Na^+-依赖性葡萄糖转运蛋白(图 10-40),GLUT5 主要负责葡萄糖进入小肠的通路。另一方面,由于 GLUT5 对果糖的亲和力高,所以它的生理上的重要性可能与饮食中果糖的摄入有关。

GLUT7 在序列上有 68%与 GLUT2 的序列相同,它主要存在于肝细胞内质网上。肝脏中,G6P 在葡萄糖-6-磷酸酶的作用下脱磷酸,磷酸酶的活性部位位于内质网腔中。因此反应产物葡

萄糖经 GLUT2 转运出细胞，首先必须穿过内质网膜。

3. 激素作用的机制：信号转导

生物之所以能在各个水平将其生命活动很好的协调起来，主要依赖于复杂的信息系统，其中涉及到称之为**激素**(hormone)的化学信使。在高等动物中，**内分泌腺**(endocrine gland)合成和释放激素，通过血液运输到靶细胞(图 21-8)。我们已经讨论了固醇类激素(节 9-1E)、肽类激素胰岛素和胰高血糖素(节 15-3C)以及儿茶酚胺肾上腺素和去甲肾上腺素(节 20-6B)。除了固醇类激素能扩散通过细胞膜直接作用于胞内成分外(我们将在节 27-3B 讨论)，其他胞外信息分子必须首先与细胞表面受体结合。本文中的**受体**(receptor)指的是一种结合蛋白，它对它的配体有特异性，而且当它与配体结合时，引发出独特的生物化学效应，这一特征使受体不同于简单的结合或像肌红蛋白(节 7-1)和 GLUT1 那样的转运蛋白(节 21-2C)。

673

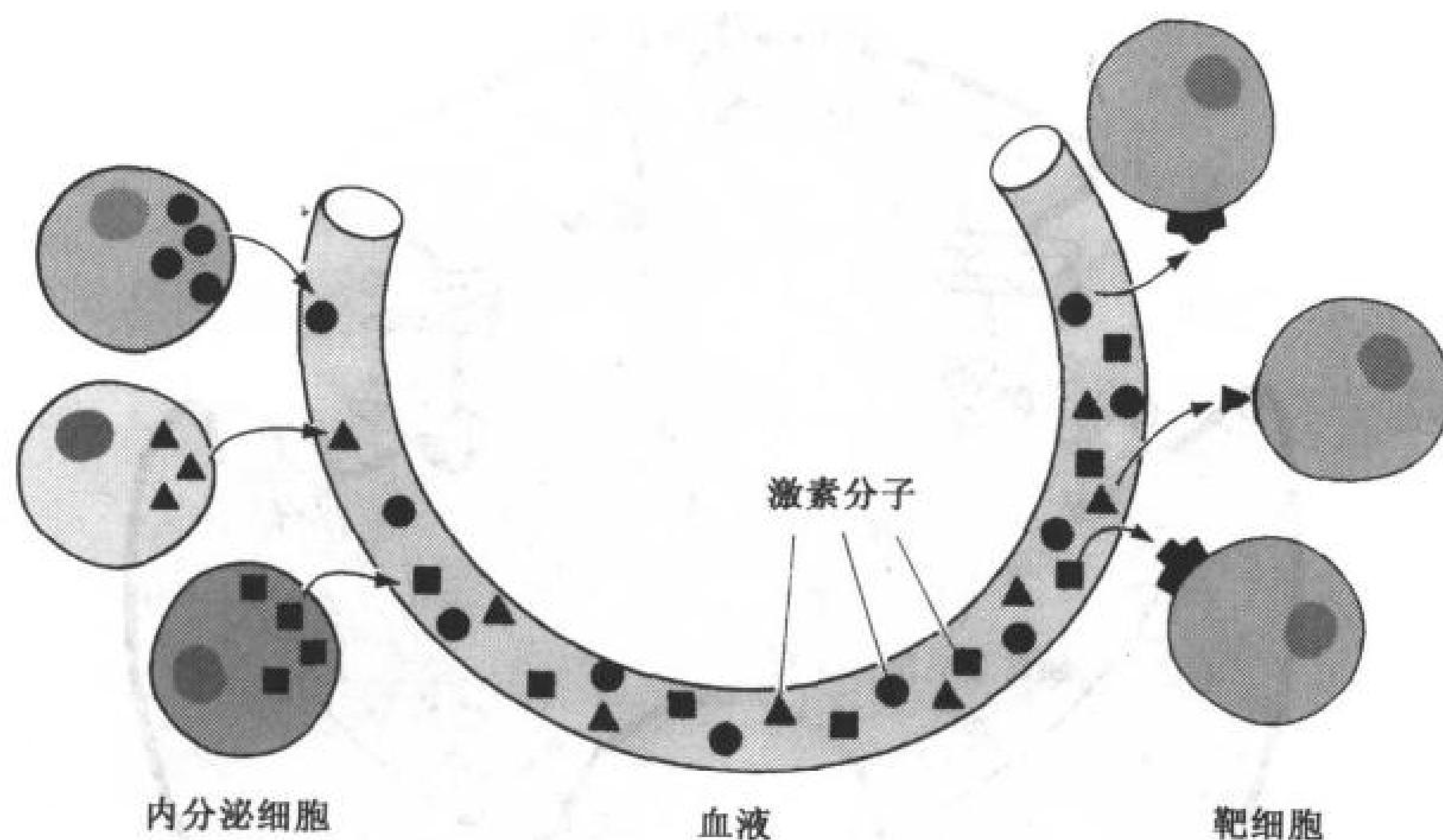


图 21-8　内分泌信号传导过程

由内分泌细胞产生的激素经循环系统到达作用的靶细胞。只有表达有合适受体的细胞才能对激素产生应答。

胞外配体(如激素)与其受体结合将信号**传导**(tranduce，传递)入细胞内，这一信号转导引发了一系列生物化学反应，这些反应产生了生物应答，例如代谢途径的改变、细胞的分化或细胞生长和分裂。细胞应答的准确性取决于许多因素。细胞对一个配体的应答仅在其具有相应受体时才出现。胞内特异的应答受到信号传递系统各组成成分数量、类型、胞内分布位置等因素的调节。同时，一个特定细胞通常含有许多不同配体的受体，因而对一个特定配体的应答可能取决于信号转导机器内的其他配体参与的水平。

信号转导途径的复杂性意味着细胞能对不同的单个信号或综合信号作出反应，且在细胞效应的幅度和周期方面都有变化。以下描述的信号转导途径是一个多步骤途径，能够提供很多机会来放大或减弱其应答。此外，这些途径可以被激活或钝化，这主要是途径中的细胞蛋白的磷酸化和去磷酸化的结果，这可以改变它们内在的活性或与其他蛋白的相互作用。

A. 燃料代谢的激素调节

人类内分泌系统分泌大量多种多样的激素，能够使机体

1) 维持**内环境稳态**(homeostasis；一种稳定的状态，例如：无论是饱餐后还是禁食期，胰岛素和胰高血糖素都能将血糖水平基本维持在一个固定的范围内)；
2) 对大量外界刺激作出应答(例如，通过分泌肾上腺素及去甲肾上腺素准备"搏斗或逃走")；
3) 追随不同的循环和发育进程(例如性激素调节性别分化、性成熟、月经周期和妊娠过程)。

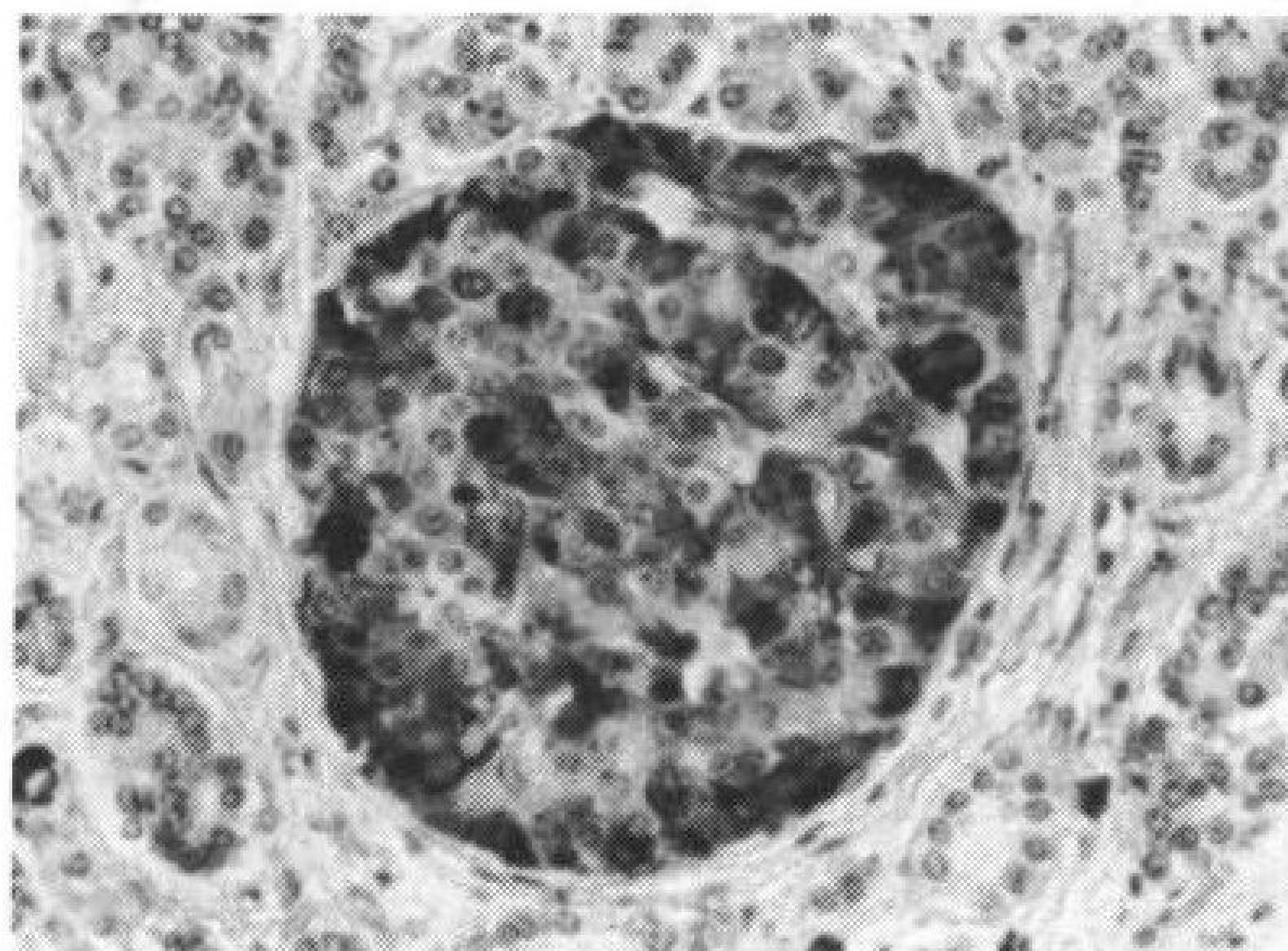


图 21-9　胰腺细胞
产激素的胰岛细胞(图中表示为棕色小点)仅占胰腺总细胞的一小部分，其余的胰腺细胞用于合成消化酶。(©Parviz M. Pour / Photo Researchers, Inc)

机体内各种各样的内分泌腺不仅仅只是独立分泌器官的简单集合，而是形成了一个复杂的、高度相互依赖的调节系统。下面，我们将集中对燃料代谢的主要调节激素进行讨论。

胰腺激素调节葡萄糖和脂肪酸的贮存与释放

胰腺是一个大的腺器官，它们的主要贡献是产生一些消化酶，例如：胰蛋白酶、RNaseA、α-淀粉酶和磷脂酶 A_2，这些分泌的蛋白经胰腺导管进入小肠。然而，约 1%～2 %的胰腺组织是由一些分散的称为**胰岛**(islet of Langerhans，图 21-9)的细胞团块组成的，它可分泌多肽类激素进入血液。这些激素和其他分泌的蛋白一样，先在核糖体中合成无活性的前体，然后经粗面内质网和高尔基体加工形成成熟激素，储存在分泌颗粒中等待激素信号，然后通过胞吐形式释放(节 10-2D)。　674

胰岛中的 **β 细胞**响应高血糖水平分泌胰岛素(51 个氨基酸残基，图 5-1)。胰岛素刺激肌肉、肝脏和脂肪细胞通过合成糖原、蛋白质和脂肪贮存燃料为以后利用。胰岛中的 **α 细胞**响应低血糖分泌胰高血糖素(29 个残基，节 15-3C)，它具有与胰岛素基本相反的生理效应：促进肝脏通过糖原酵解和糖异生作用释放葡萄糖，同时促使脂肪组织通过脂解作用释放脂肪酸。

肾上腺髓质分泌儿茶酚胺

肾上腺由两种不同类型的组织构成：**髓质**(medulla，核心部分)和**皮质**(cortex，外层部分)。髓质事实上是神经系统的延伸，而皮质作为更为典型的腺体部分，可以合成并分泌固醇类激素。肾上腺可以以酪氨酸为起始物，合成去甲肾上腺素及其甲基化衍生物——肾上腺素(如节 20-6B 所述)。这些儿茶酚胺类物质贮存在颗粒中，随时准备在神经系统的调节下，以胞吐的形式分泌出去。

儿茶酚胺类激素的生物学效应通过两类受体实现：**α-和 β-肾上腺素受体**。这些受体分布在哺乳动物的一些分散的组织中，通过儿茶酚胺类激素的调节产生不同甚至是相反的应答。例如，β-肾上腺素受体能激活腺苷酸环化酶(节 21-3B)，促进肝脏中的糖原分解和糖异生，促进脂肪组

织中的脂解过程，并使得支气管和供给骨骼肌的血管的平滑肌舒张，同时使心脏的活动增加。反之，α-肾上腺素受体的胞内效应是通过抑制腺苷酸环化酶或是经磷酸肌醇级联反应（节 21-3D）实现的，它促进供给外周器官（如皮肤和肾脏）的血管的平滑肌收缩，胃肠壁的平滑肌舒张，同时使血小板聚集。许多这些不同的效应直接导致一个共同的结果，将能源物质代谢，并将它们分流到最需要的场所为机体应对突发事件做准备。

B. 腺苷酸环化酶信号系统

许多激素和其他胞外信号是通过含有 7 个跨膜的 α 螺旋的内在膜糖蛋白受体来发挥其生理效应的。细菌视紫红质（图 10-4）就是这样的一种蛋白，尽管它不是激素受体。β-肾上腺素受体（图 21-10）也是该类受体的一个成员，肾上腺激素肾上腺素和去甲肾上腺素与受体 N 端的细胞外结构域结合。

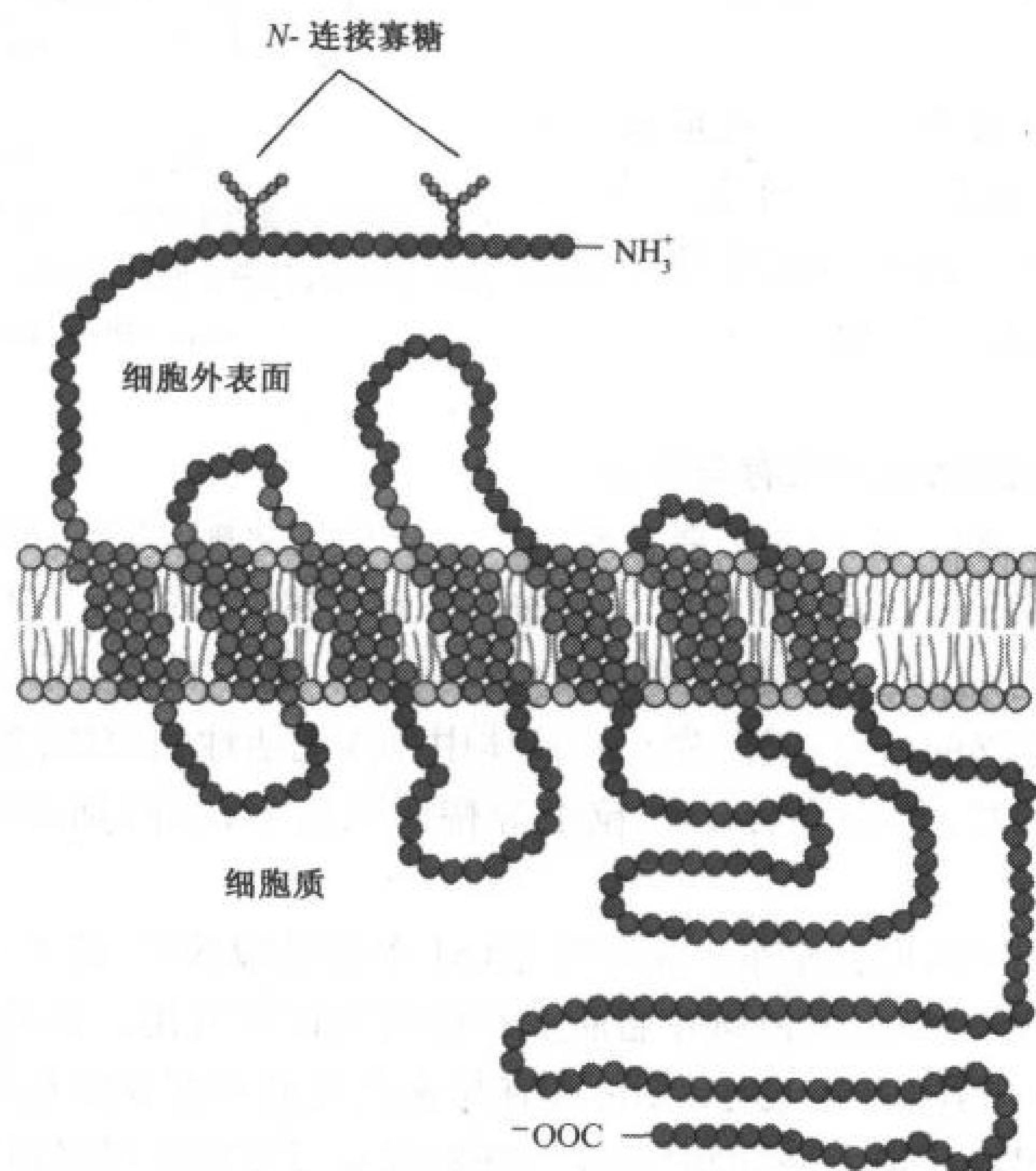


图 21-10　人类 β-肾上腺素受体

分别含有约 24 个疏水氨基酸残基（图中用棕色环表示）的 7 个片段说明该糖蛋白含有 7 个跨膜 α 螺旋。［引自 Dohlman, H.G., and Lefkowitz, R.J., Biochemistry 26, 2660 (1987)］

配体 L 与其受体 R 结合形成复合物 RL 的强度（$R + L \rightleftharpoons RL$）可以用解离常数来描述：

$$K_D = [R][L] / [RL] \tag{21-1}$$

肾上腺素与其 β-肾上腺素受体结合的解离常数是 $5 \times 10^{-6}\ mol \cdot L^{-1}$。配体与 β-肾上腺素受体胞外结构域的结合可能导致其构象的变化，并将这一变化传递至胞内结构域。

675

人们认为细胞表面受体的作用可能像别构蛋白如血红蛋白（节 7-2E）那样，通过两种不同构象（一种结合了配体，另一种没有结合）之间的转变，受体可以将一胞外信号传递至胞内。受体作

用的这一模型类似于一些膜转运蛋白(如图 10-35)。事实上,一些膜受体是离子的通道,它们通过开放和闭合构象之间的转换来响应配体的结合。

异三聚体 G 蛋白参与胞内的响应

真核细胞内许多肾上腺素受体和多肽类激素受体可以激活胞内的**异三聚体 G 蛋白**(heterotrimeric G-protein),之所以这样命名是因为它可以结合鸟嘌呤核苷酸 GTP 和 GDP,它是由分子质量分别为 45kDa、37kDa 和 9kDa 的 α、β 和 γ 亚基组成的。异三聚体 G 蛋白家族至少含有 20 个成员,它们分别由现已确认的不同的 α 亚基(15 种)、β 亚基(5 种)和 γ 亚基(6 种)构成。然而,所有的 G 蛋白结构基本相似,如图 21-11 所示。蛋白通过 γ 亚基 C 端的异戊二烯化或十四烷酸化与质膜相联,在有些情况下,是通过 α 亚基 N 端的十六烷酰化与膜连接的(节 10-18)。α 亚基 N 端紧挨着位于 G 蛋白一侧的 β 亚基排列,这样使得绝大部分 α 亚基游离出来,与其他蛋白发生作用。

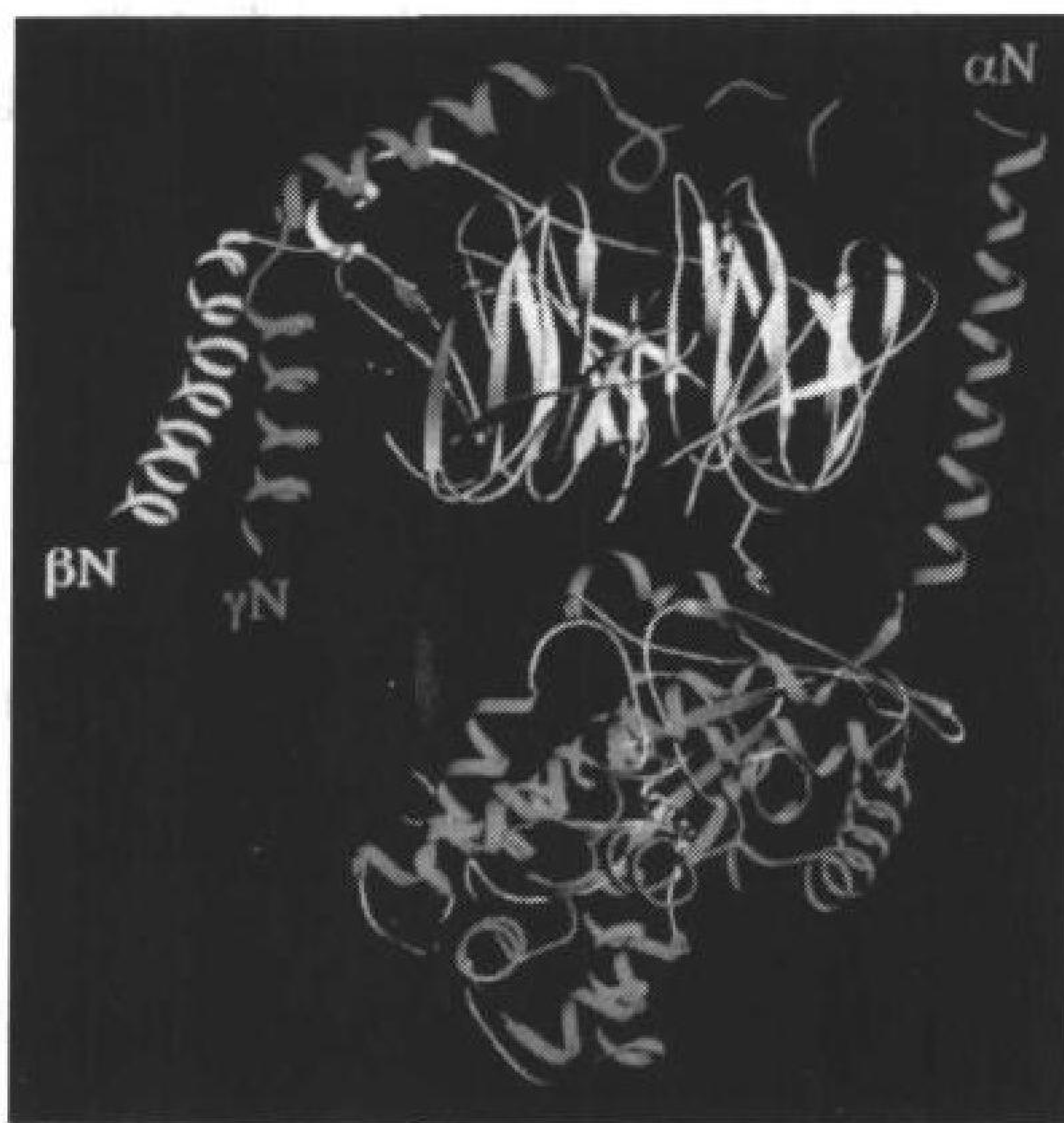
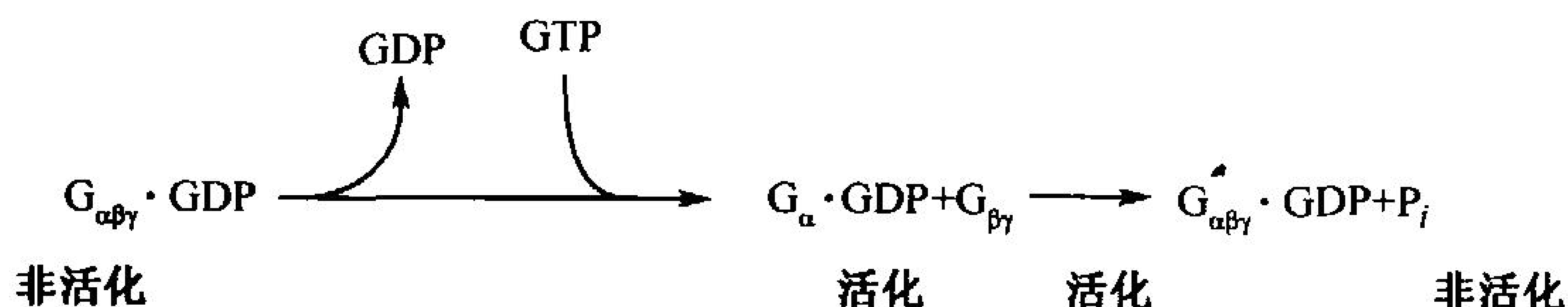


图 21-11　G 蛋白的带状模式图

α 亚基是蓝色的(其上的红色区域是称为 switch II 的区域),β 亚基是黄色的,γ 亚基是绿色的,GDP 分子结合在 α 亚基上(图中用棒状实体表示)。三个亚基的 N 端均已在图中标记。(引自 Mark Wall and Stephen Sprang, University of Texas Southwestern Medical Center)

当 GDP 与 G_α 亚基结合时,G 蛋白处于失活状态。在配体与其相应受体结合后,G 蛋白与受体的胞内部分相互作用,相互作用诱导 G_α 释放它结合的 GDP,转而与 GTP 结合。同时,G 蛋白解离成 G_α 和 $G_{\beta\gamma}$ 两个组分,然后每一组分都能激活胞内的其他组分(见下文)。

但是,由于 G_α 同时也是一种 **GTPase**,可以以每分钟2～3 个分子的速率水解 GTP 生成 GDP 和 P_i,因而 G 蛋白的激活效应是短暂的。GTP 的水解使 G 蛋白重新组装成非活性的结合 GDP 的异三聚体。



676

GTP 水解的速率非常快,因此不会产生应答失控的现象(一个受体分子能激活几个 G 蛋白,而每个 G 蛋白又能作用于许多其他蛋白)。当然,由于受体被其配体连续占据,会导致 G 蛋白激活的重复循环,从而造成一个相对延长的细胞响应。

环 AMP(cAMP)是第二信使

在 β 肾上腺素受体中,$G_\alpha\cdot GDP$ 复合物激活质膜中的腺苷酸环化酶,后者将 ATP 转化为 cAMP(节 15-3B)。细胞中 cAMP 的浓度取决于其合成(由腺苷酸环化酶催化)和分解(通过一特

殊的磷酸二酯酶催化)的相对速率。cAMP 是个极性的、可在胞质中自由扩散的分子，也被称之为第二信使，因为它将激素信号(第一信使)传递至胞内。

cAMP 是 cAMP 依赖性蛋白激酶(cAPK)活性所必需的。cAPK 可将细胞蛋白的 Ser 或 Thr 残基磷酸化。cAPK 的作用底物包括糖原代谢中所需的酶(节 15-3)。因此，当肾上腺素与肌细胞上的 β-肾上腺素受体结合时，G 蛋白、腺苷酸环化酶和 cAPK 依次被激活，导致糖原磷酸化酶的激活，产生“搏斗或逃走”中糖酵解所需的葡萄糖-6-磷酸。

腺苷酸环化酶是可调控的

某些激素受体抑制而不是激活腺苷酸环化酶。这种抑制效应是通过一种“抑制型”G 蛋白(G_i)的调节来实现的。G_i 通常含有与“激活型”G 蛋白(Gs)相同的 β 和 γ 亚基，但 α 亚基不同。G_i 的作用类似于 Gs，当它与其相应的配体-受体复合物结合时，它的 α 亚基便将 GDP 与 GTP 交换。然而，$G_{i\alpha}$亚基是抑制而不是激活腺苷酸环化酶，可能是通过直接的相互作用，或者通过释放出的 $G_{\beta\gamma}$单位结合到 $G_{s\alpha}$和使 $G_{s\alpha}$隔离来实现抑制作用的。图 21-12 给出了部分以腺苷酸环化酶

677

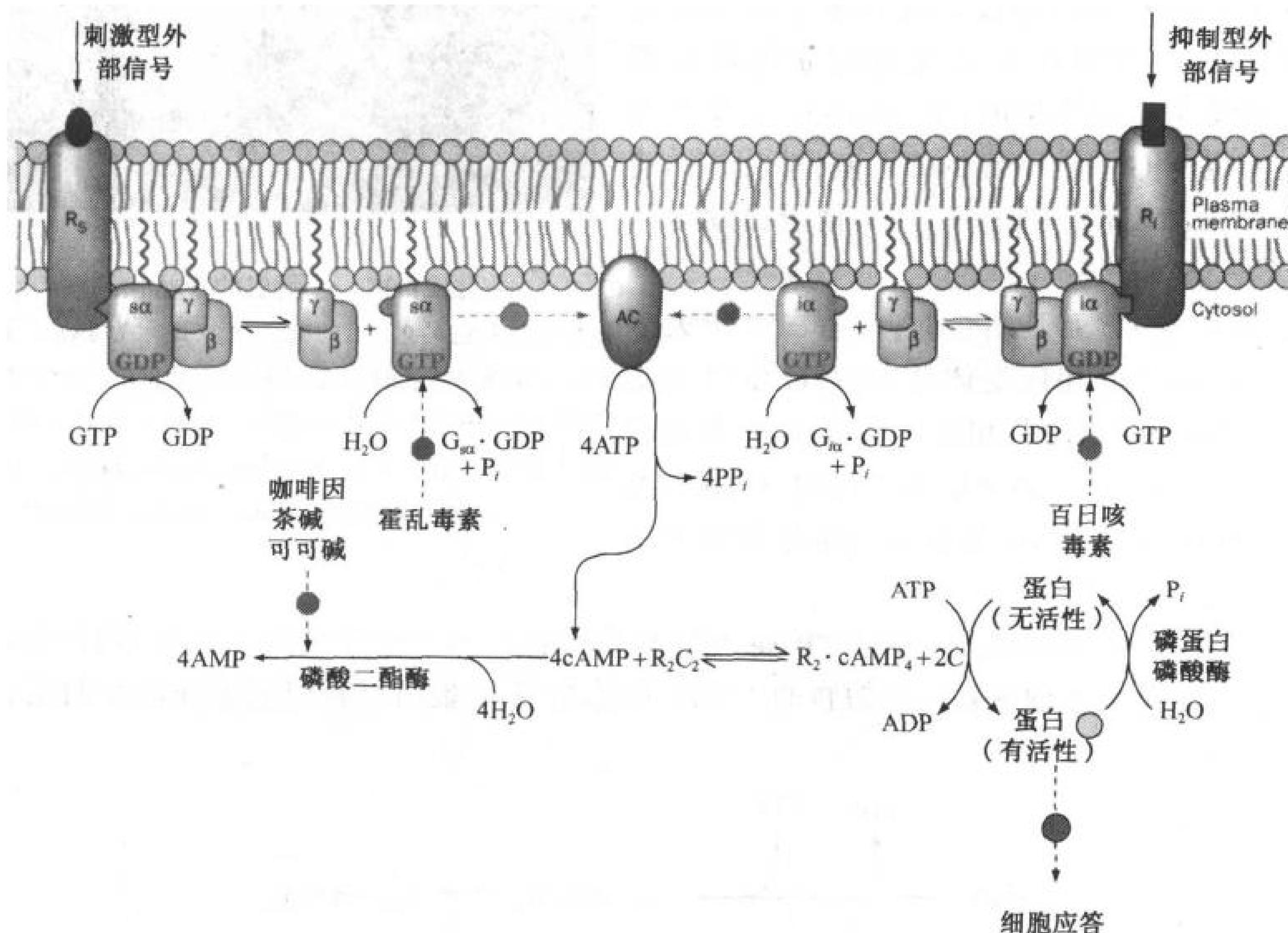


图 21-12 *功能的秘诀*：腺苷酸环化酶系统

激素与激活型受体 R_s(左)的结合会导致受体与异三聚体 G 蛋白 G_s 的结合，从而激活 $G_{s\alpha}$亚基，使结合其上的 GDP 转变为 GTP。而后，$G_{s\alpha}$·GTP 复合物从 $G_{\beta\gamma}$中释放出来，这种状态一直保持到 GTP 重新水解为 GDP，被激活的腺苷酸环化酶(AC)将 ATP 环化为 cAMP 为止。反之，激素与抑制型受体 R_i(右)的结合会引发几乎与上述完全相同的链式反应，只不过 $G_{i\alpha}$·GTP 复合物会抑制腺苷酸环化酶的活性而已。R_2C_2 代表 cAMP 依赖性的蛋白激酶，当它被调节二聚体 R_2·$cAMP_4$ 的解离激活时，它的催化亚基 C 可以通过磷酸化各种各样的胞内蛋白而将它们活化。同时，各种药物和毒素的作用位点如图所示。

为中心的信号传递系统的复杂性。

细胞应答的性质和程度最终反映了信号传导途径中所有上述复合物激活或者抑制作用的存在及其程度。例如:腺苷酸环化酶信号传递途径可以通过调节 G 蛋白的 GTPase 活性或调节把 cAMP 水解为 AMP 的磷酸二酯酶的活性来限制甚至逆转该传导途径。同时,cAPK 催化的反应在蛋白磷酸酶的作用下可发生逆转,该酶负责将含磷酸-Ser 和磷酸-Thr 的蛋白去磷酸化。许多药物和毒素就是通过修饰腺苷酸环化酶系统中的组分来发挥其效应的(框 21-1)。

生物信号传递系统的另一个特征是可以通过降低对激素信号的应答而使生物信号系统对长期刺激产生适应性,这一过程称为**脱敏**(desensitization)。因此,这些信号传递系统是对刺激水平变化的应答,而不是对它们的绝对值作出反应。以 β-肾上腺素受体为例,肾上腺素受体若持续暴露于肾上腺素会导致一个或更多受体的 Ser 残基磷酸化。这一磷酸化过程由一个特殊的激酶催化,该酶作用于激素-受体复合物,而对单独的受体没有作用,结果降低了受体对肾上腺素的亲和性。如果肾上腺素水平下降,受体渐渐去磷酸化,使细胞对肾上腺素的敏感性重新恢复。

C. 受体酪氨酸激酶

许多称之为**生长因子**(growth factor)的蛋白激素通过与其受体结合促进靶细胞的生长与分化。这类受体 C 端的胞内区具有**酪氨酸激酶**(tyrosine kinase)活性,因而也被称为**受体酪氨酸激酶**(RTK),它们通常只含有一个跨膜片段,且在无配体结合时以单体的形式存在。这些结构特征使得结合在胞外结构域上的配体不可能引起胞内结构域构象的变化(这样一种构象变化在含有多个跨膜区段的受体中较为可能,例如 β-肾上腺素受体,图 21-10)。事实上,活化 RTK 的最普遍的途径是配体诱发的受体蛋白的二聚体化(例如配体的结合使两个单体受体聚合成一个二聚体)。

人的生长激素受体(缺乏酪氨酸激酶活性)可以作为一种配体诱导的受体二聚体化模型。用 X 射线晶体衍射手段对含有 191 个氨基酸残基的**生长激素**(growth hormone)和含有 238 个氨基酸残基的激素受体胞外结构域进行研究,结果表明:两分子完全相同的受体分子与一分子的生长激素结合(图 21-13)。有趣的是,复合物中的两个受体单体与非对称性的激素分子的不同部位通过相同的配体结合部位结合起来,这就使得复合物中的两个受体单位以接近精确的二折对称形式联系起来。

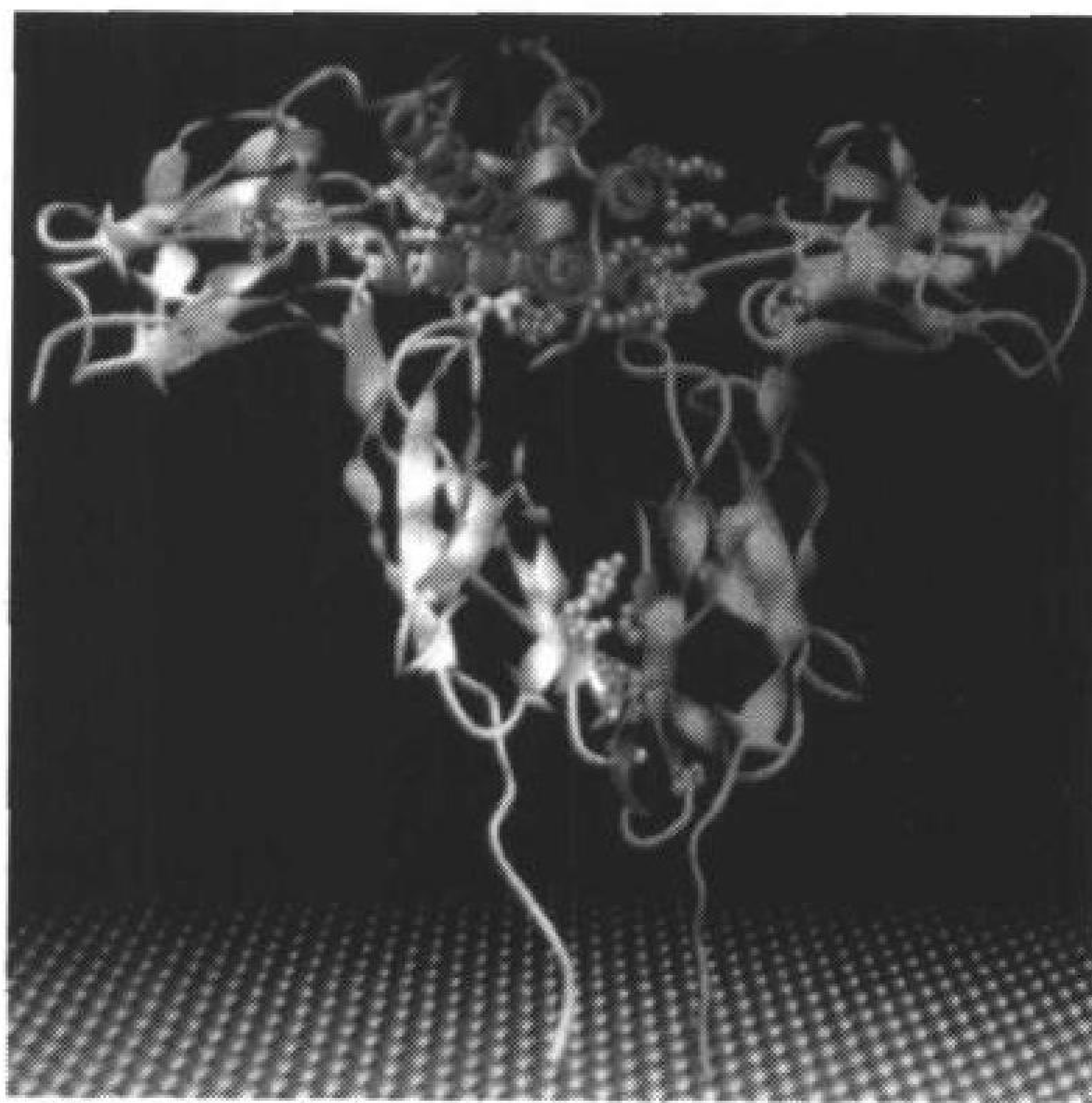


图 21-13 人类生长激素与其受体结合所形成的复合物的 X 射线结构

两分子完全相同的受体胞外结构域(图中用蓝色和绿色带状模型表示)与单一分子的生长激素(红色)结合。一些参与亚基间相互作用的侧链如图所示,以一种空间填补物的形式存在。黄色鹅卵石构成的表面代表细胞膜。(引自 Abraham de Vos and Anthony Kossiakoff, Genentech Inc., South San Franciso, Caifornial)

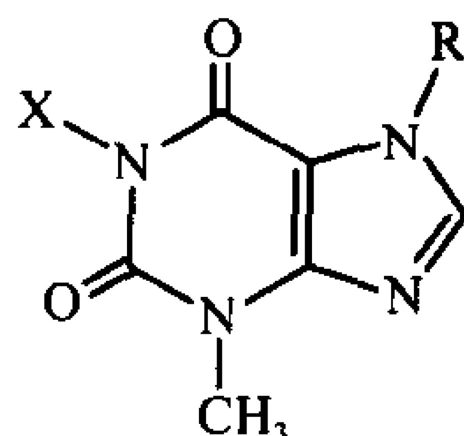
679

二聚体化使受体的胞内结构域以使其激活的方式结合在一起。对 RTK 而言,激活是通过两个酪氨酸激酶中的酪氨酸残基的交叉磷酸化实现的。这一**自磷酸化**(autophosphorylation)过程使得酪氨酸激酶能够使另外的胞质蛋白中的 Tyr 磷酸化,而这些蛋白质很有可能其自身就是一种蛋白激酶。激活的 RTK,正如我们所看到的,也可以不经由磷酸化过

框 21-1 健康和疾病的生物化学

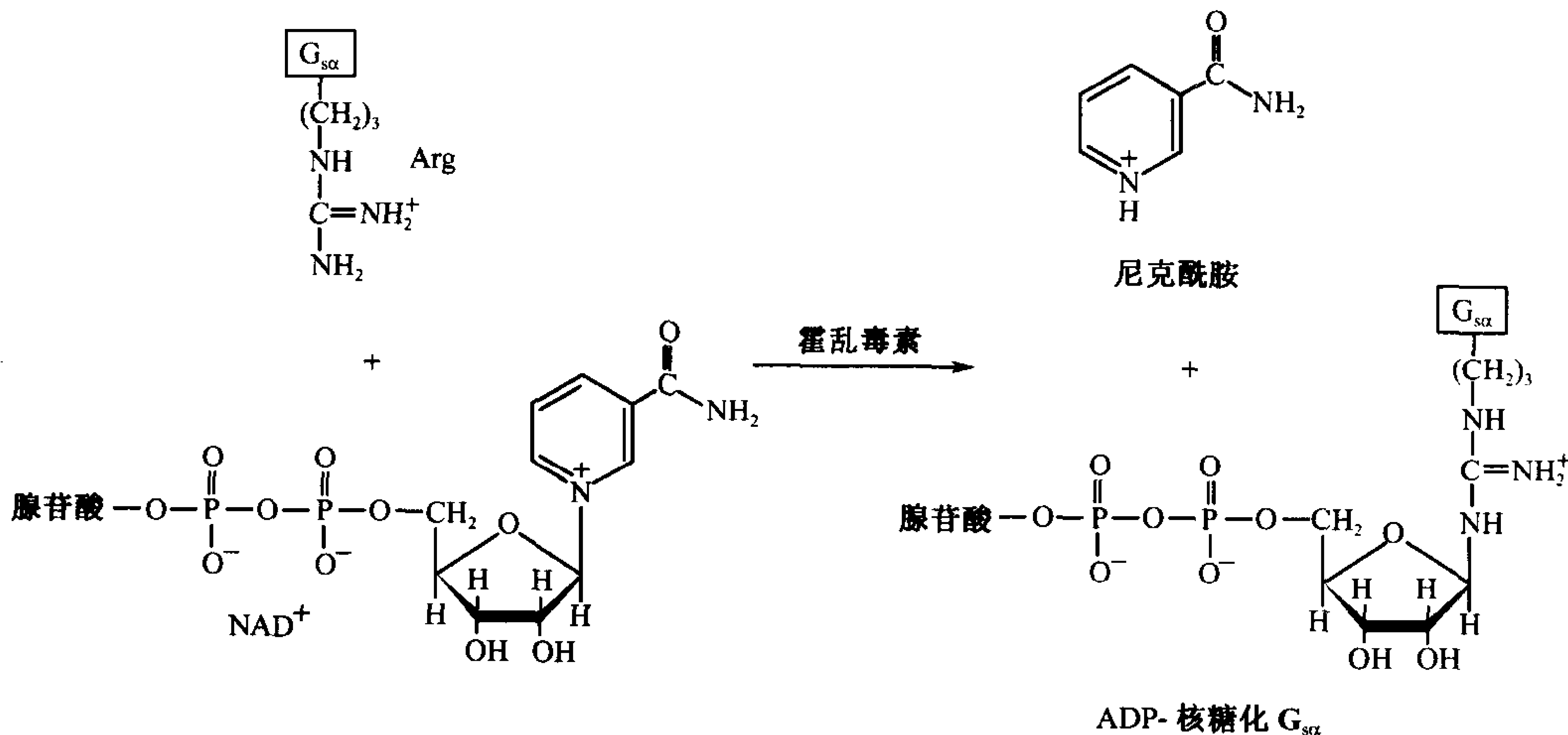
影响细胞信号转导的药物和毒素

一些复杂的过程,例如腺苷酸环化酶信号转导系统可遭到多种试剂的破坏。例如:甲基化嘌呤衍生物咖啡因(咖啡的组成成分)、茶碱(在茶中发现的)和可可碱(在巧克力中发现的)在一定程度上是刺激物,因为它们抑制 cAMP 磷酸酯酶活性,延长了产生 cAMP 的激素的作用时间。



$R=CH_3$	$X=CH_3$	咖啡因(1,3,7-三甲基黄嘌呤)
$R=H$	$X=CH_3$	茶碱(1,3-二甲基黄嘌呤)
$R=CH_3$	$X=H$	可可碱(1,7-二甲基黄嘌呤)

干扰异三聚体 G 蛋白功能的某些细菌毒素会产生致死效应。例如:*Vibrio cholerae*(导致霍乱的细菌)释放的毒素会使机体在一个短时间内因腹泻而损失至少 1L 的大量体液。因此,患者若不及时补充损失的水与盐类物质的话,将导致死亡。霍乱毒素的相对分子质量为 84kDa,其亚基组成为 AB_5,可以通过 β 亚基与肠细胞表面的神经节苷酯 G_{M1} 结合。这可能使得毒素以受体介导的胞吞的形式进入细胞,在细胞中释放出 A 亚基的 195 个氨基酸残基的蛋白水解片段。这一片段可催化 ADP-核糖基团从 NAD^+ 转移到 $G_{S\alpha}$的一个特定的 Arg 侧链上(如下所示)。



ADP-核糖化的 $G_{s\alpha}$·GTP 可以激活腺苷酸环化酶,但却不能水解结合在其 α 亚基上的 GTP(图 21-12)。因此,腺苷酸环化酶被锁定在其活化状态上,细胞内 cAMP 水平提高约 100 倍。肠细胞在正常条件下会对胞内 cAMP 水平的细微上升作出反应,分泌出消化液(一种富含 HCO_3^- 的盐溶液)。因此,当以上情况发生时,肠细胞对于升高的 cAMP 浓度必然作出相应的响应,分泌出大量的消化液。

其他细菌毒素的作用机制与此相似。大肠杆菌的一种特定菌株会引起与霍乱相似的腹泻病症,但症状较之要轻。它产生的热不稳定肠毒素(heat-liable enterotoxin)是与霍乱毒素极为相似的蛋白质(它们的 A、B 亚基同源性大于 80%),且它们的作用机制相同。百日咳毒素(由 *Bordetella pertusis*——产生百日咳的细菌分泌,该菌每年导致全球约 400 000 婴儿的死亡)是一种亚基结构为 AB_5 的蛋白,它与霍乱毒素同源,将 $G_{i\alpha}$上的一特定 Cys 残基 ADP-核糖化。被修饰的 $G_{i\alpha}$无法使结合其上的 GDP 与 GTP 交换,因而不能抑制腺苷酸环化酶(图 21-12)。

程对其他蛋白的活性进行修饰。

许多各种各样的与自磷酸化受体结合的胞质蛋白都含有一个或两个称之为 **Src 同源 2 (SH2) 结构域**（由于它们与已知的 Src 蛋白的一段结构域序列相似而得名）约 100 个氨基酸残基的保守组件，SH2 结构域以高亲水性与磷酸-Tyr 残基结合，却不与胞质中更为充裕的磷酸-Ser 和磷酸-Thr 残基结合。对这一特异性的解释很简单，X 射线结构研究表明：磷酸-Tyr 是与处于深沟底部的 Arg 相互作用的（图 21-14）。相比之下，Ser 和 Thr 的侧链因太短而无法与该残基发生作用。

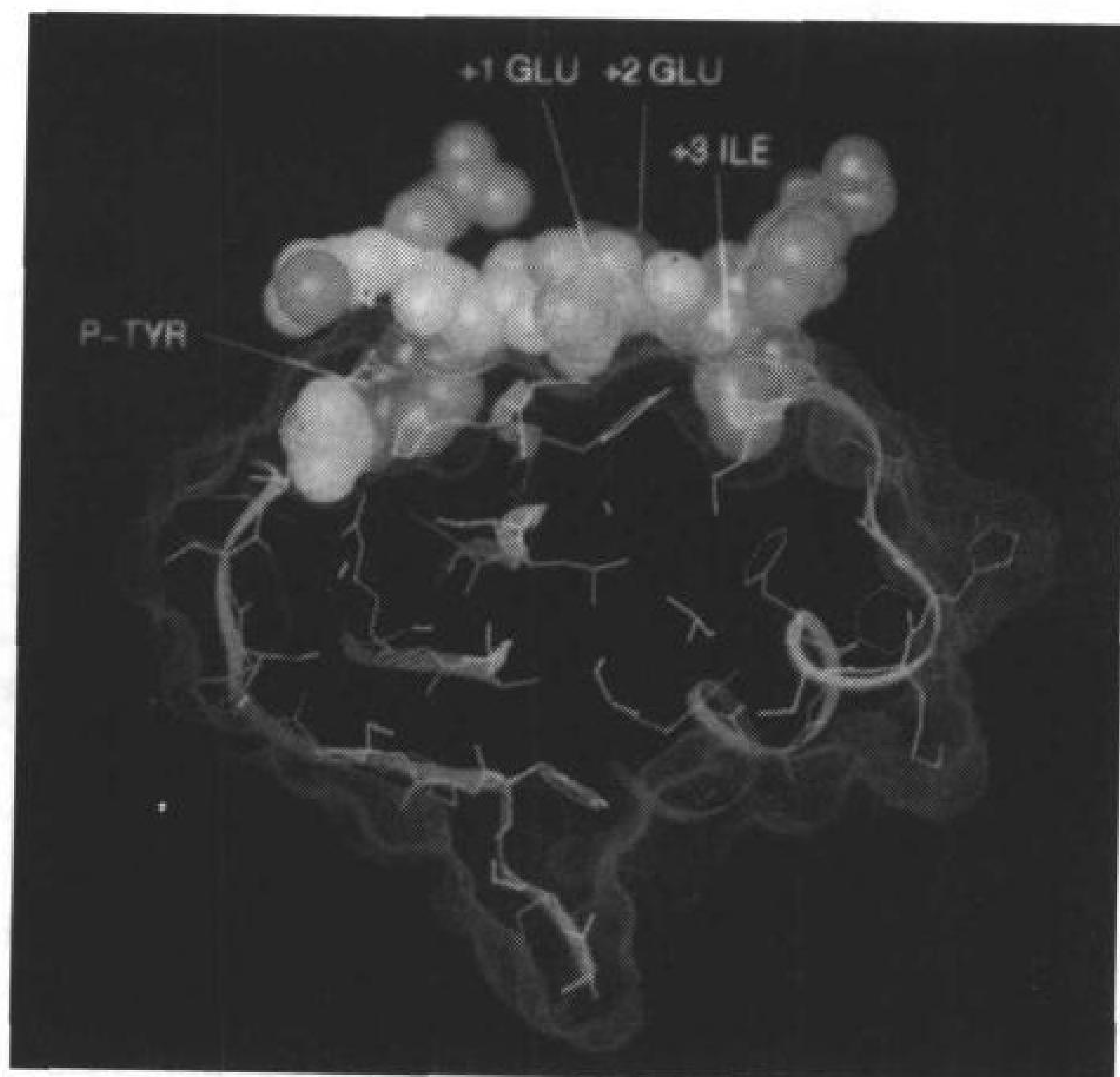


图 21-14 Src SH2 结构域的 X 射线结构

如图所示，一段含有蛋白的磷酸-Tyr-Glu-Glu-Ile 靶四肽的 11 个氨基酸的多肽与 SH2 结构域结合。图中，蛋白的表面用红点表示，蛋白主链（粉红色）用带状模式表示，其侧链用柱状模式表示。束缚肽段 N 端的 8 残基片段以空间填补形式显示，它的主链为黄色，侧链为绿色，磷酸基团为白色。（引自 John Kuriyan, The Rockefeller University）

受体 Tyr 激酶和含 SH2 结构域的蛋白之间的相互作用固定了该蛋白使其磷酸化或直接改变它的活性（图 21-15）。一些本身不具有酪氨酸激酶活性的生长因子受体在与其配体结合发生二聚化后，通过与胞内酪氨酸激酶结合并激活它。虽然这些激酶与不同的受体结合，但它们却可使相互搭接的一套靶蛋白磷酸化。这种相互作用的复合物网解释了为什么不同胞外信号经常可以激活一些相同的胞内途径。

680

像其他的胞内信号一样，胞质中的酪氨酸激酶在该系统完成信号传递后，必须被“关闭”。这一“关闭”过程是由**蛋白酪氨酸磷酸酶**（protein tyrosine phosphatase）来完成，它可使磷酸-酪氨酸残基去磷酸化。

Ras 介导多步骤的信号转导途径

通过对一些亲缘关系远近不同的生物的信号转导过程的分子遗传学分析发现了一条极其保守的途径，在该途径中，RTK 将结合配体的信号转导给一种称为 **Ras** 的单体 G 蛋白，随后，Ras

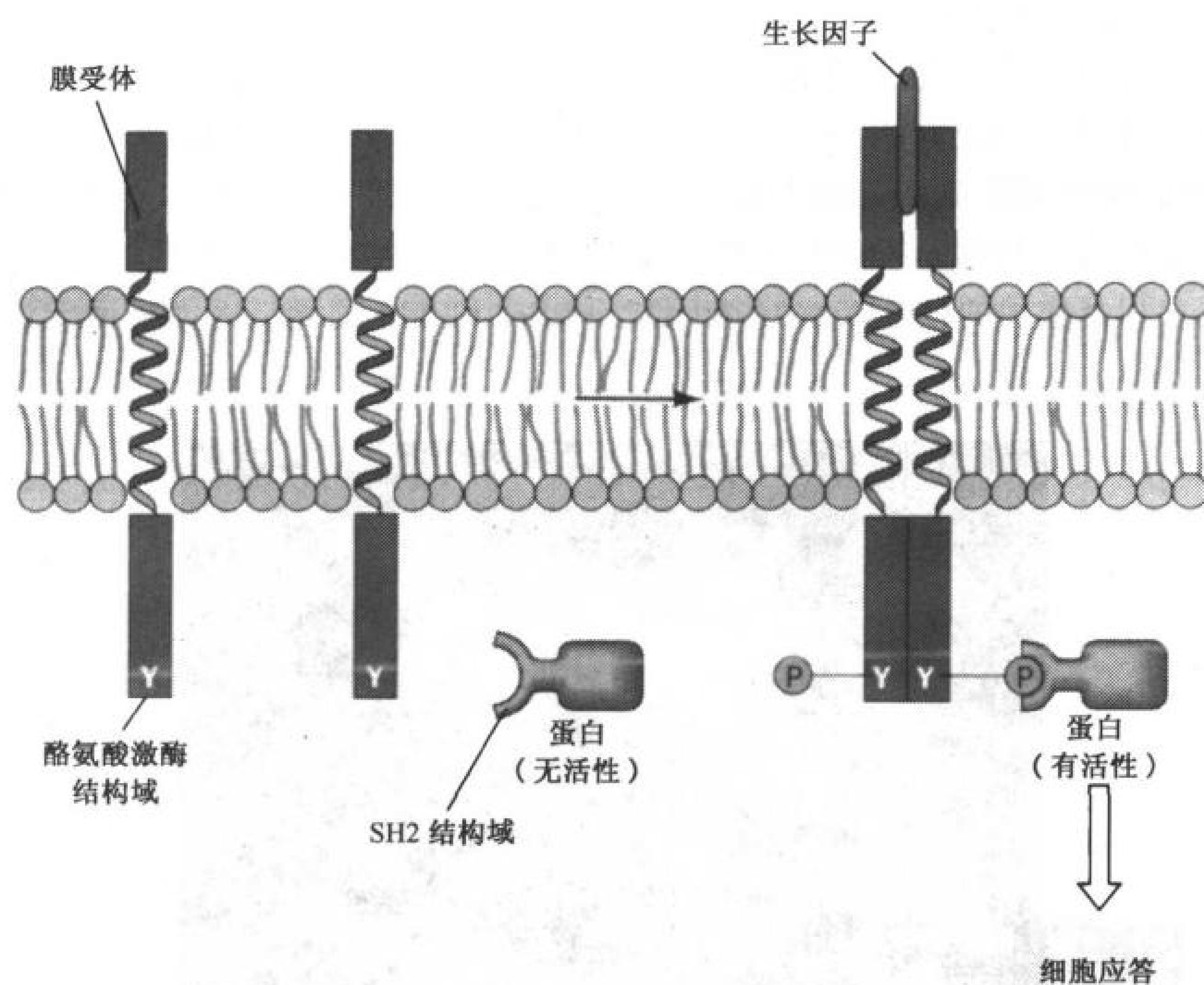


图 21-15 受体酪氨酸激酶的活化

生长因子的结合导致其细胞表面受体的二聚化。胞内酪氨酸激酶结构域之间彼此磷酸化（自磷酸化），从而使其与含SH2结构域的胞内蛋白结合。SH2与磷酸-Tyr的结合活化了含SH2的蛋白。在一些情况下，含SH2结构域的蛋白上特定的 Tyr 残基可以被受体酪氨酸激酶磷酸化。

继续通过"激酶的级联反应"将这一信号转导到细胞核的转录装置。这一系统调节是像细胞生长和分化那样的必不可少的生理功能。

生长因子与它的 PTK 结合导致 PTK 的自磷酸化。随后，磷酸化的 RTK 与含 SH2 的蛋白发生相互作用（图 21-16）。许多含有 SH2 结构域的蛋白同时还有一个或多个不相关的 **SH3 结构域**，该结构域通常含有 50～70 个氨基酸残基。SH3 结构域结合富含 Pro 的 9 个或 10 个残基的序列，它也存在于在缺少 SH2 结构域的蛋白中，这两种类型的结构域调节激酶与调节蛋白之间的相互作用。在图 21-16 所示的信号级联转导过程中，一种称为 **Grb2**（在线虫 *Caenorchabditis elegans* 中称为 **Sem-5**）的含有 217 个氨基酸残基的哺乳动物蛋白几乎完全是由一个 SH2 结构域和两个位于其两侧的 SH3 结构域构成的，它与一个含有 1596 个氨基酸残基的 **Sos 蛋白**共同形成一复合物。Sos 含有一段能特异性结合 SH3 结构域的富含 Pro 的序列。Grb2-Sos 复合物将活化的 RTK 与 Ras 连接起来，使 Ras 将结合其上的 GDP 与 GTP 交换，从而使自身活化。只有 Ras·GTP 才具有将信号由 RTK 继续往下转导的功能。然而，Ras 和其他 G 蛋白一样，会将 GTP 水解成 GDP 和 P_i，从而限制细胞对生长因子响应的程度。Ras 本身水解 GTP 的半衰期为 1～5 小时，这对于有效的信号转导来说太过缓慢。由此，人们发现了 **GTPase 激活蛋白**（GAP），这是一种 120kDa 的蛋白质，它可以将 Ras 水解 GTP 的速率提高 5 个数量级。

Ras 下游的信号转导途径由一系列蛋白激酶构成的一系列级联反应构成（图 21-16，右侧）。

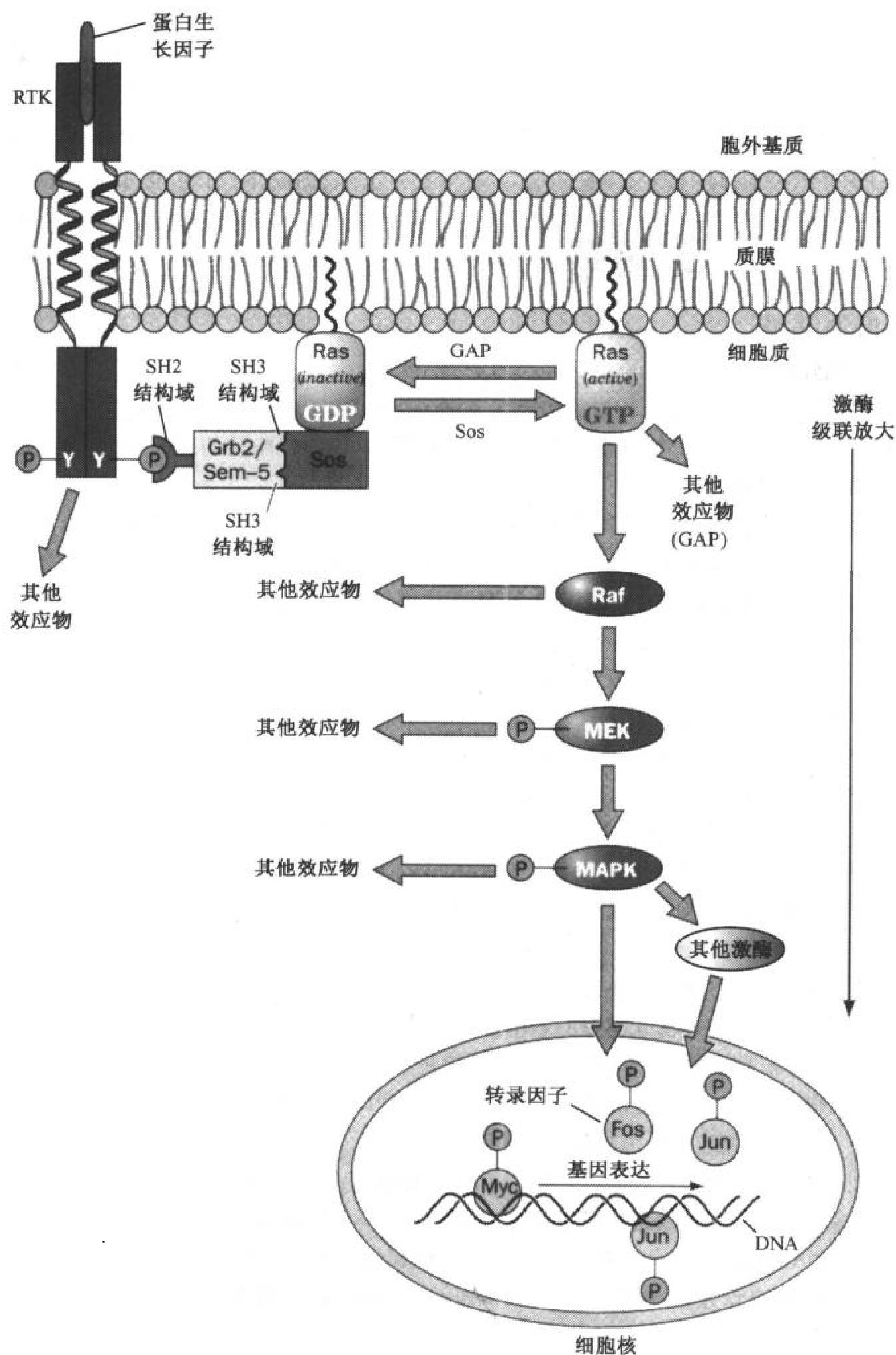


图 21-16　Ras 信号传导级联反应

RTK 与其相应生长因子的结合可以引发 RTK 胞内结构域的自磷酸化。Grb2/Sem-5 可以通过其 SH2 结构域与含磷酸-Tyr 的肽段结合,同时通过其上的两个 SH3 结构域与 Sos 结合,将 Sos 活化。活化的 Sos 将结合在 Ras 上的 GDP 转变为 GTP,从而使得 Ras 与 Raf 结合。随后,信号传导途径经历了一个激酶级联反应过程,Raf(一种 Ser/Thr 激酶)磷酸化 MEK,后者接着磷酸化 MAPK。磷酸化了的 MAPK 可以迁移入核中,对一些转录因子进行磷酸化作用（如:Fos, Jun 和 Myc），从而达到调节基因表达的目的。[引自 Egan, S.E. and Weinberg, R.A., Nature 365, 782 (1993)]

Ser / Thr 激酶 **Raf** 通过与 Ras·GTP 的直接作用被活化，它将进一步使称为 **MEK** 或 **MAP 激酶**的激酶磷酸化，使 MEK 激活成为一个激酶，被激活的 MEK 可以继续使被称之为**促分裂原活化蛋白激酶（MAPK）**或**胞外信号调节激酶（ERK）**的蛋白家族磷酸化。MAPK 必须在其序列 Thr-Glu-Tyr 中的 Thr 和 Tyr 均被磷酸化后才具有完全的活性。MEK（即 MAP 激酶/ERK 激酶活化激酶）催化这两个氨基酸的磷酸化，因而它既是 Ser / Thr 激酶，同时也是 Tyr 激酶。

682

框 21-2 健康和疾病的生物化学

致癌基因与癌症

机体中细胞的生长与分化通常受到严格的调控。因此，除了一些特例外（如：成血细胞和毛囊），成人机体中的大部分细胞大多处于相对的静止状态中。然而，由于种种原因，某一细胞的增殖过程可能失控，并导致肿瘤的形成。恶性肿瘤（癌症）的增长方式可以说是侵略性的，它会对生命造成威胁。美国死亡人口的 20% 是由癌症引起的。

在癌症众多诱因中，携带致癌基因（希腊语：*onkos*，团块或肿瘤）的病毒是其中一种。例如：劳斯肉瘤病毒（*Rous. sarcoma viras*，RSV）可在鸡中诱发肉瘤（来源于结缔组织的癌症）。它含有 4 个基因，其中 3 个基因是病毒复制所必需的，而第四个基因 v-*src*（“v”代表病毒，“*src*”代表肉瘤）是一个致癌基因，它诱导肿瘤的形成。那么，究竟 v-*src* 来自何处？它是如何发挥功能的？Michael Bishop 和 Harold Varmus 在 1976 年所做的杂交研究中发现：未受感染的鸡细胞含有基因 c-*src*（“c”代表细胞），它与 v-*src* 同源，并在很多真核生物中高度保守。这预示着 v-*src* 是一个必要的细胞基因。显然，v-*src* 最初通过一非成瘤的 RSV 祖先从细胞中获得的。v-*src* 和 c-*src* 都编码一个 60 kDa 的酪氨酸激酶。然而，c-*src* 的活性受到严格调控，而 v-*src* 却无此控制。因此，v-*src* 的存在使宿主细胞维持在增殖的状态中。由于细胞受 RSV 的感染并没有被杀死，这可能提高了病毒的复制速率。

其他致癌基因同样与调节细胞生长的过程相关。例如：v-*erbB* 致癌基因是一种表皮生长因子（EGF）受体的截短形式，它缺乏与 EGF 结合的结构域却保留其跨膜区段和酪氨酸激酶结构域。这一激酶在无胞外信号作用的条件下仍然可使其靶蛋白磷酸化，因而促使细胞增殖失控。

v-*ras* 致癌基因编码一种 21kDa 的蛋白质 $P21^{v\text{-}ras}$，它与细胞的 Ras 相似，但水解 GTP 的速率要慢得多。GTP 水解对蛋白质磷酸化速率的刹车作用减缓，导致 Ras 下游激酶活性的增加。

对 Ras 介导的信号转导（例如：Fos 和 Jun）响应的转录因子也可由原癌基因编码。原癌基因是正常细胞中的致癌基因类似物。病毒基因 v-*fos* 和 v-*jun* 编码的蛋白与细胞中它们的对应物几乎完全相同，它们对宿主细胞的效应也极为相似，但不能调控。

致癌基因并不一定是来自病毒。事实上，人类的癌症很少是由病毒引起的。反之，癌症的形成大多是由于原癌基因的突变导致癌基因的形成。例如：c-*ras* 基因的突变使 Ras 上的 Gly12 转变为 Val，这降低了 Ras 的 GTPase 活性却不改变它促使蛋白磷酸化的能力。因此，Ras 处于“开”状态的时间延长了，必然导致细胞增殖的失控。事实上，c-*ras* 的癌基因版本是人类癌症中最常见的癌基因之一。

时至今日，我们已鉴定出约 50 种癌基因。这些癌基因的破坏效应主要来源于它们与正常细胞中相应蛋白的差别：它们可能具有不同的合成和/或分解速率；它们的细胞功能可能发生了变化，它们可能不受细胞调节机制的调控。然而，一个正常细胞要发生恶性转化（成为一个癌细胞）必须经过若干（平均 5 个）致癌事件。这反映了细胞信号传导网络的复杂性（细胞要同时对细胞中存在的不同的激素、生长因子和转录因子作出反应），同时也解释了癌症发生几率随年龄的增长而增加的原因。

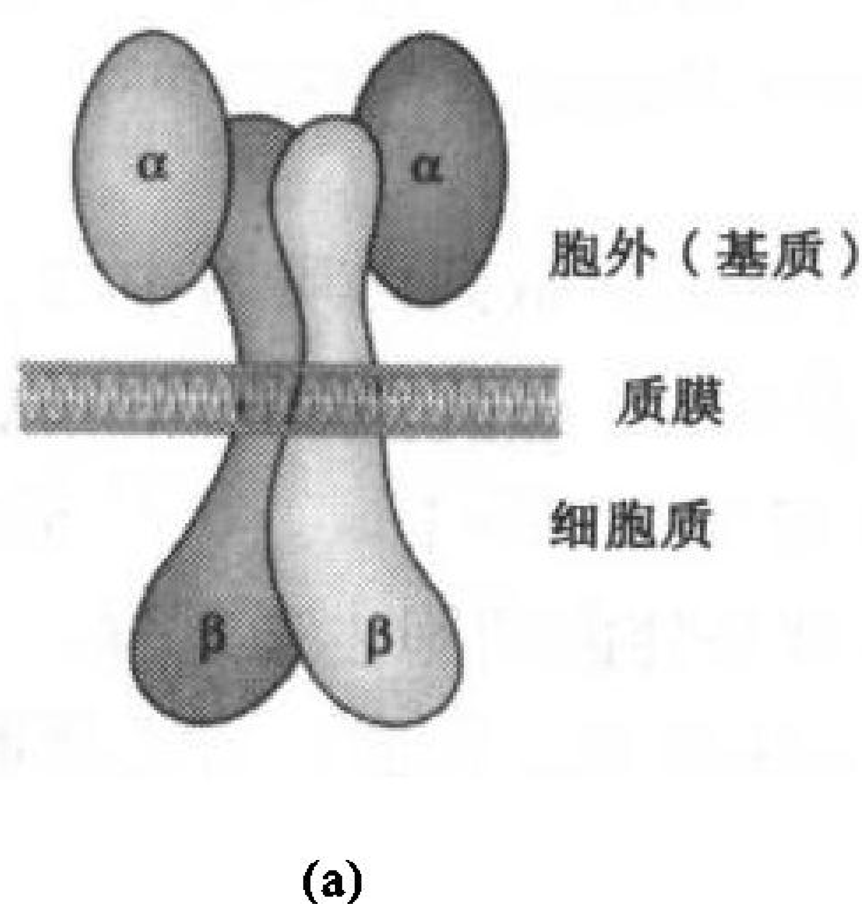
活化的 MAP 激酶从胞质迁移至核中，在核内它使包括 **Fos**、**Jun** 和 **Myc** 在内的一系列蛋白质磷酸化。这些蛋白质是**转录因子**（transcription factor，诱导靶基因转录的蛋白质，节 25-21C）：一旦被活化，它们可以激活各种基因产生相应的效应，这些效应正是通过引发该信号转导级联途径的胞外生长因子所委派的。许多由癌基因编码的不同蛋白会干扰该信号转导途径，从而诱导无控制的细胞生长（见框 21-2）。

胰岛素受体是二聚体

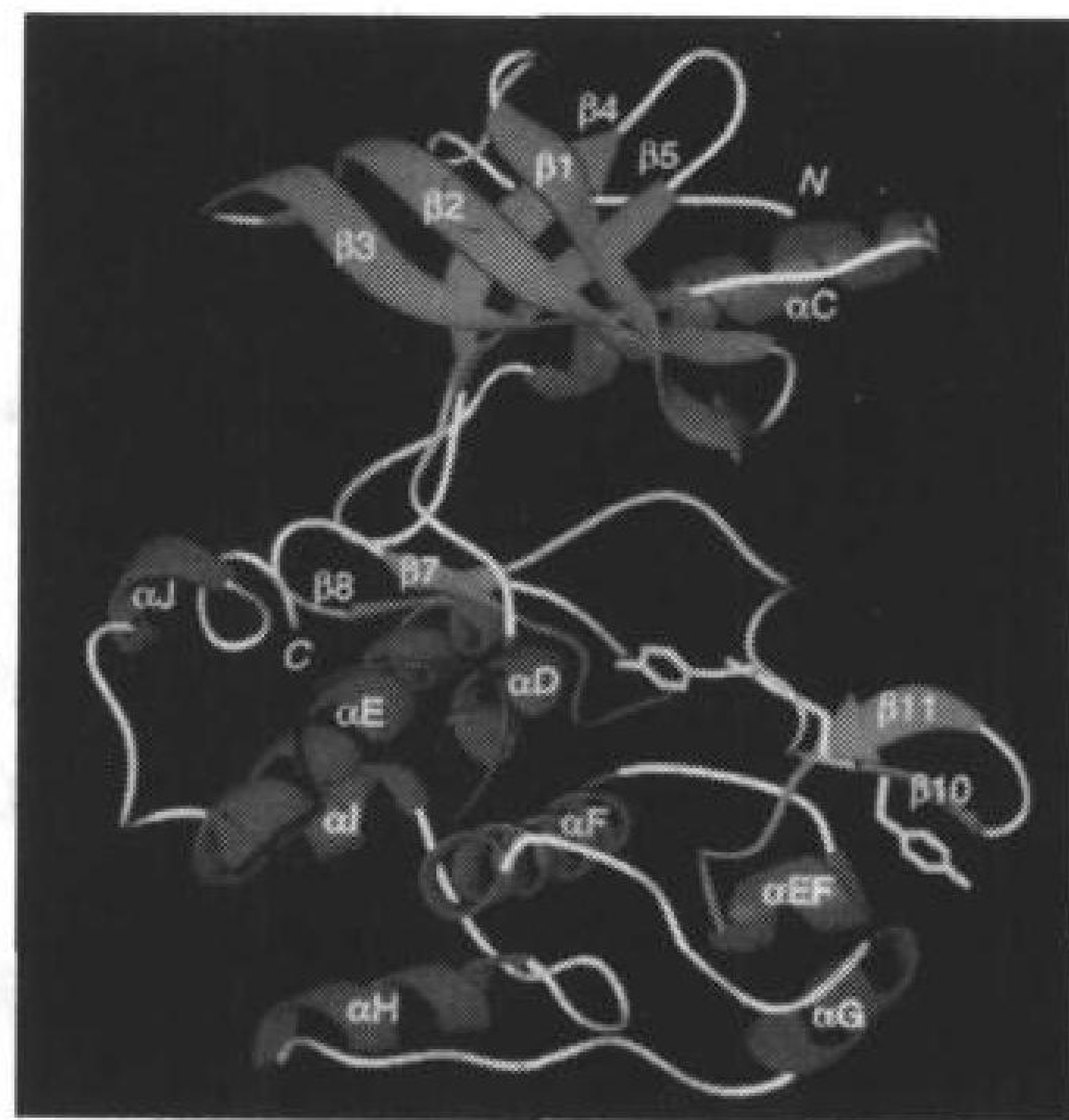
胰岛素受体是一个具有酪氨酸激酶活性的跨膜糖蛋白。它几乎存在于所有的脊椎动物的细胞中，其受体密度以肝细胞和脂肪细胞中为最高。与其他酪氨酸激酶不同的是，胰岛素受体在没有配体结合的状态下仍是一个二聚体。它的两个原始聚合单体首先以单一多肽链的形式分别被合成出来，随后多肽链被水解成成熟的受体，受体亚基组成为 $\alpha_2\beta_2$（图 21-17a）。胰岛素与完全位于胞外的 α 亚基结合。跨膜 β 亚基的胞内部分含有酪氨酸激酶结构域，它的 X 射线衍射图谱（图 21-17b）与那些 Ser / Thr 特异性的蛋白激酶（例如 cAPK；图 15-14）相似。从胰岛素 RTK 与 cAPK 的活性部位的比较能看出胰岛素 RTK 可特异地使 Tyr 磷酸化，而不对 Ser 或 Thr 残基发生作用的原因：Ser 和 Thr 残基太短了，无法到达胰岛素 RTK 的磷酸转移部位。

683

当胰岛素与一个或两个 α 亚基结合时，受体的胞内结构域构象发生变化，受体自磷酸化（图 21-17b），因而其酪氨酸激酶活性增加。胰岛素受体似乎并不与含 SH2 的蛋白直接结合，然而，活化的受体使其他蛋白磷酸化，其中包括称为**胰岛素受体底物-1**（IRS-1）的蛋白，后者然后与某些含有 SH2 的蛋白结合。



(a)



(b)

图 21-17　胰岛素受体

(a)受体由两个跨膜的 β 亚基和两个胞外的 α 亚基构成。受体 α 亚基上具有胰岛素的结合位点，β 亚基的胞质部分具有酪氨酸激酶活性。(b)胰岛素受体酪氨酸激酶结构域的 X 射线结构。图中红色代表 α 螺旋，绿色代表 β 折叠，机械指示的环则用各种颜色表示。三个自磷酸化的 Tyr 侧链（很可能被其对面的 β 亚基磷酸化）用黄色表示。（引自 Wayne Hendrick-son, Columbia University）

IRS-1 是胰岛素行使许多生理功能所必需的，虽然确切的机制至今还未完全搞清楚。IRS-1 的靶蛋白包括一些参与多步磷酸化级联反应的激酶，这些级联反应最终将改变参与糖原和脂肪酸代谢的酶的活性。

D. 磷酸肌醇途径

磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸（PIP_2，图 21-18）是一种磷酸化的甘油磷脂，它是质膜胞质侧的少量组分之一，是一种转导许多激素信号的第二信使系统的一部分。与腺苷酸环化酶系统相似，**磷酸肌醇途径**（phosphoinositide pathway）包括一个带有 7 个跨膜片段的受体，一个异三聚体 G 蛋白和一种特异的蛋白激酶。配体结合受体激活 G 蛋白 **Gq**，随后它的锚膜 α 亚基带着 GTP 沿质膜侧向扩散激活膜结合的**磷脂酶 C**（phospholipase C）。激活的磷脂酶 C 催化 PIP_2 的甘油-磷酸键水解（节 9-1C），产生**肌醇-1,4,5-三磷酸**（IP_3）和 **1,2-二酰甘油**（DG，图 21-18）。

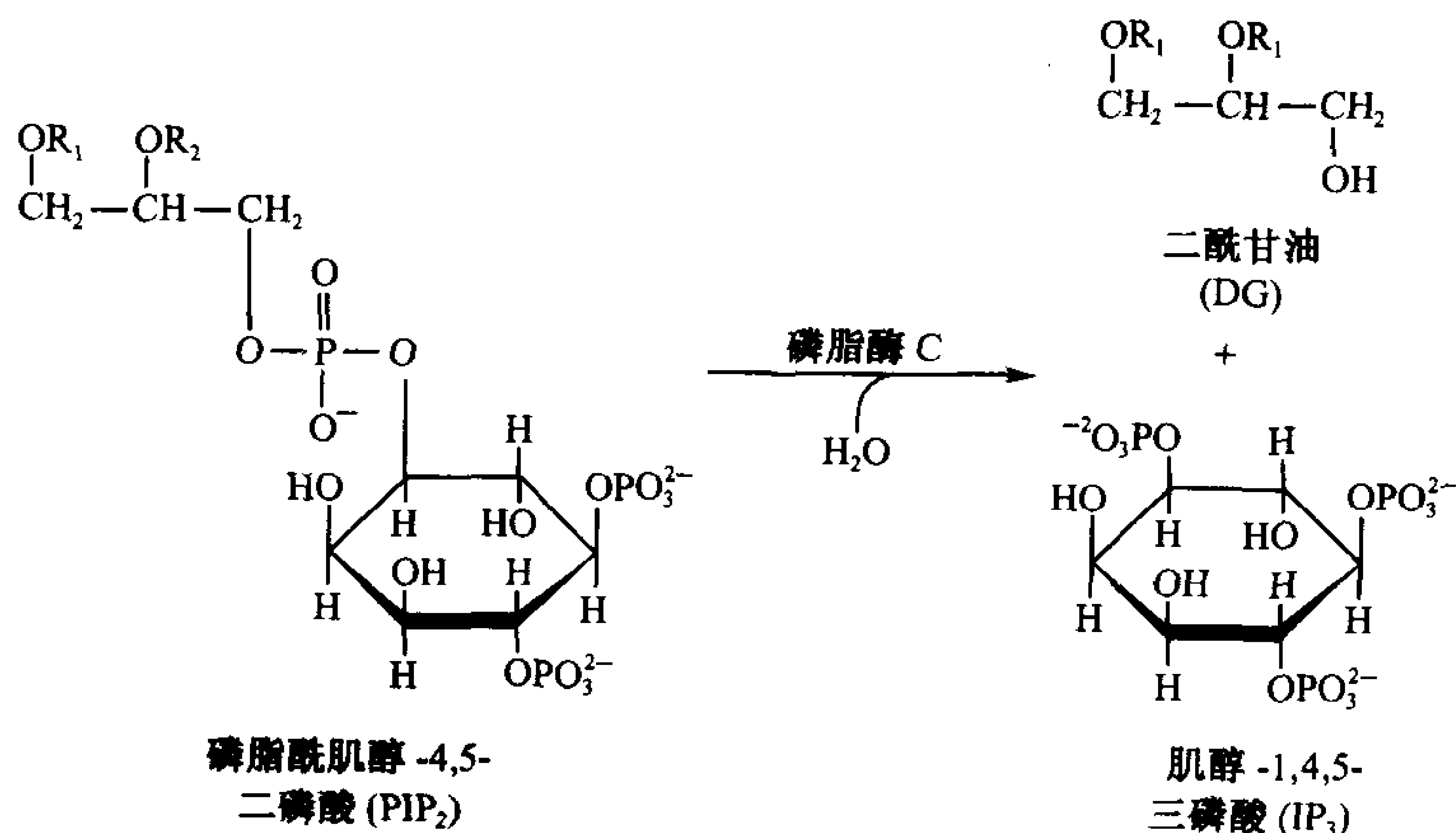


图 21-18 磷酸肌醇-4,5-二磷酸和其水解产物

PIP_2 被磷脂酶 C 裂解后形成第二信使二酰甘油（DG）和肌醇-1,4,5-三磷酸（IP_3）。（前缀 bis 和 tris 分别代表两个和三个单独与肌醇连接的磷酰基团；在二磷酸和三磷酸中，磷酰基团是按顺序连接的）

684

带有电荷的 IP_3 分子是一个水溶性第二信使，它可以从胞质扩散到内质网中去。在那儿，它与 Ca^{2+} 转运通道（既是受体又是离子通道）结合，并诱导其开启，从而引发内质网中 Ca^{2+} 的外流。Ca^{2+} 的外流使胞质中 $[Ca^{2+}]$ 从约 0.1 $\mu mol \cdot L^{-1}$ 上升到 10 $\mu mol \cdot L^{-1}$。Ca^{2+} 通过钙调蛋白（节 15-3B）和它的同系物引发如糖原代谢和肌肉收缩等各种各样的细胞生理过程。

磷脂酶 C 酶解产生的非极性产物二酰甘油是一种脂溶性的第二信使。它仍然嵌在质膜上，可以激活**蛋白激酶 C**（protein kinase C）去使若干不同的细胞蛋白磷酸化，从而达到调节它们活性的目的。整个磷酸肌醇信号传递系统如图 21-19 所示。

现在已获知存在多种不同的蛋白激酶 C，它们在组织中的表达、胞内分布、活化所需的 DG 量都不相同。在无外界刺激时，蛋白激酶 C（PKC）是一种磷酸化了的胞质蛋白。DG 的作用增加了 PKC 对膜的亲和性，也帮助稳定它的活性构象。PKC 的充分激活需要磷脂酰丝氨酸（磷脂酰丝氨酸只存在于胞质一侧），在有些情况下，也需要 Ca^{2+}（Ca^{2+} 可能由第二信使 IP_3 的作用提供）。

磷脂酶 C 水解含胆碱的磷脂也可以产生 DG，但是这些 DG 不仅与来自于 PIP_2 的不同，而且

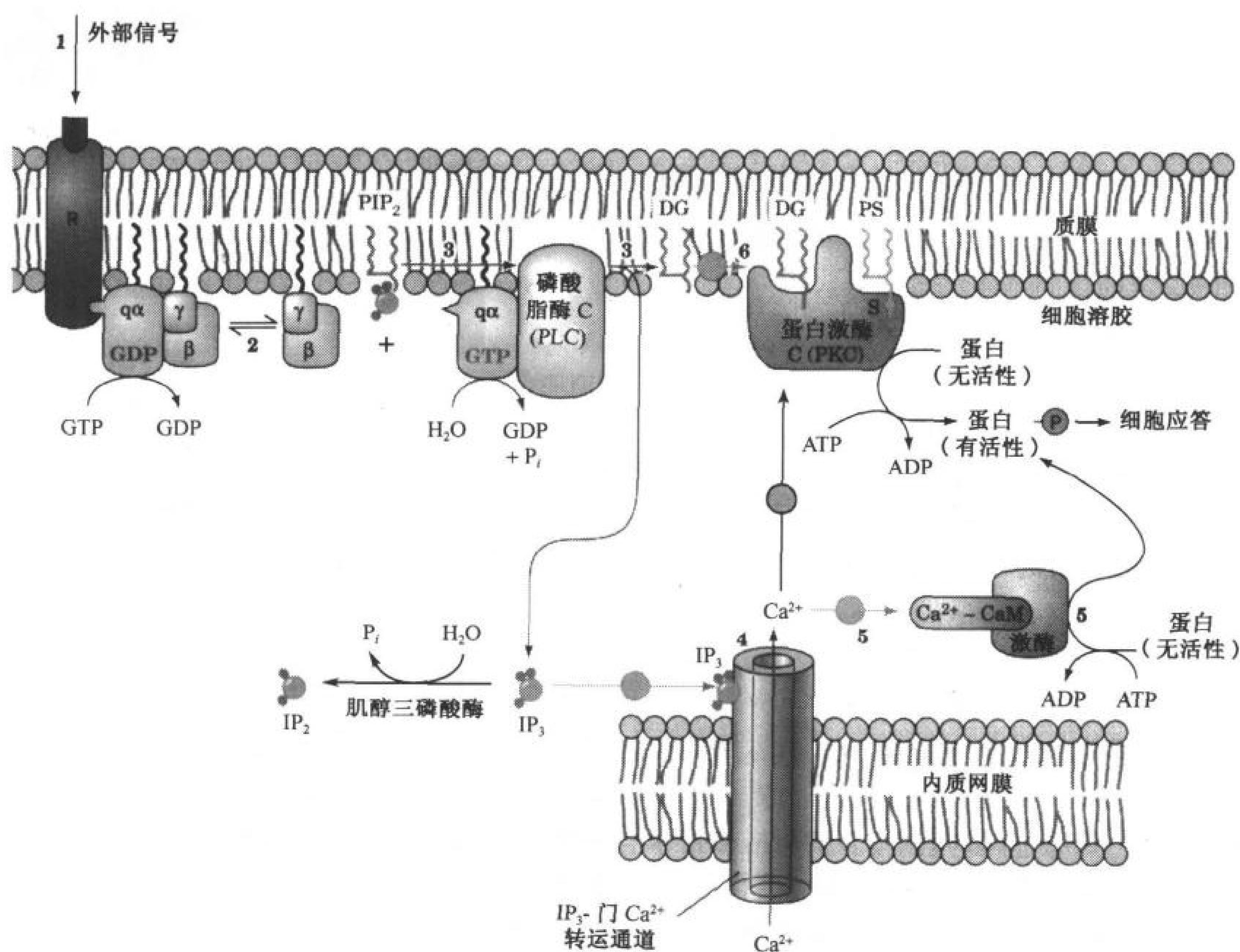


图 21-19　功能的秘诀：磷酸肌醇信号传导系统

(1)配体与细胞表面受体 R 的结合通过异二聚体 G 蛋白 Gq 活化磷脂酶 C。(2)磷脂酶 C 催化 PIP_2 水解为 IP_3 和 DG。(3)水溶性的 IP_3 活化和释放积存在内质网中的 Ca^{2+}。(4)后者接着可通过钙调蛋白(CaM)活化大量胞内反应。(5)非极性的 DG 仍然与膜结合，它可以活化蛋白激酶 C，使其磷酸化并调节大量胞内蛋白的活性。(6)蛋白激酶 C 的活化同样也需要膜磷脂酰丝氨酸(PS)和 Ca^{2+} 的存在。

它们对蛋白激酶 C 的作用效果也不同。另一种脂类第二信使——鞘脂水解产生的鞘氨醇，会抑制蛋白激酶 C 的活性。蛋白激酶 C 与 cAPK 的催化活性是相似的，它们都可以使 Ser 和 Thr 残基磷酸化。

某些细胞中的磷酸肌醇信号转导途径产生的 DG 绝大部分是硬脂酸-2-花生四烯醇甘油。该物质可进一步降解为花生四烯酸，为机体提供合成有生物活性的类二十烷(前列腺素和血栓烷，节 9-1F)的前体。在另一些细胞中，IP_3 和 DG 很快经循环回到质膜中，重新合成 PIP_2。一些酪氨酸激酶受体可以激活含有 2 个 SH2 结构域的磷脂酶 C，这就为**细胞信号交流**(cross-talk)——即不同信号转导途径的交互作用提供了一个很好的例证。与其他信号转导系统相似，磷酸肌醇系统可因为系统中第二信使的破坏而限制其功能的发挥，例如，通过肌醇三磷酸酶的破坏作用(图 21-19)。

685

4. 燃料代谢失调

调节哺乳动物燃料代谢机制的复杂性使机体能有效地响应变化了的能量需求，以及适应各种不同燃料可利用性的变化。然而，这样复杂的系统有时也会发生功能失调，引起一些严重程度不一样的急、慢性病症。人们通过大量研究，试图阐明一些病症发生的分子基础，例如糖尿病和肥胖症，这两种病基本上是燃料代谢失调造成的。在本节中，我们讨论发生在饥饿、肥胖和糖尿病中的一些代谢变化。

A. 饥饿

人们摄取食物的过程并不是连续的，因此在两次进食之间的几个小时间隔中，来源于饮食的燃料的积累和机体现存燃料的动员有很大变化。如果人体持续保持不进食的状态，仅依靠机体燃料代谢的调整的话，也能存活几个月之久。这种代谢的可塑性无疑在现代人适应于一日三餐的日常饮食之前已经存在了。

吸收的燃料被即时配置

当机体摄入的食物被消化后，营养物质降解成一些小的、通常是单体的物质，被肠黏膜吸收，并经循环系统运输到机体的其他部位，例如食物中的蛋白质被降解成氨基酸而被机体吸收。当氨基酸从门静脉进入肝脏后，它们可能被用来合成蛋白质，如果还有剩余，可能被氧化用来提供能量。机体中不存在专门的氨基酸储存库；未被肝脏代谢的无论什么物质都随血液被运送到机体的外周组织中去，在那儿它们或者被降解，或者用于蛋白质的合成。

食物中的糖像蛋白质那样在小肠中被降解，并且可被吸收的单体（例如，来自于食物淀粉的葡萄糖）由门静脉转运到肝脏。约有 1/3 的食物葡萄糖在肝脏中立即转化为糖原，余下的至少有 1/2 被转换为肌肉细胞中的糖原，而其余的葡萄糖被肝脏、肌肉和其他组织氧化用来提供机体所需的能量。胰岛素可以刺激葡萄糖的吸收和糖原的合成，它在血液中的浓度会随血糖浓度的增加而升高。

686

食物脂肪以三酰甘油的形式被包裹在乳糜微粒中（节 19-1），它首先进入淋巴循环，而后才进入血液中去。因此它与被吸收的氨基酸和糖不同，并不直接运送至肝脏，饮食中大部分脂肪酸被脂肪组织吸收。脂蛋白脂酶首先水解三酰甘油，释放的脂肪酸在脂肪细胞中被吸收和酯化。

血糖浓度保持恒定

当组织吸收并代谢葡萄糖时，血液中葡萄糖浓度下降，引起胰腺 α 细胞释放胰高血糖素。这个激素促进糖原降解，将葡萄糖从肝脏中释放出来，同时促进氨基酸和乳酸的糖异生过程。*胰岛素和胰高血糖素相反作用，它们都能够响应和调节血糖浓度，这确保了供给肝外组织的血糖浓度能维持在相对稳定的水平上。*

然而，机体储存的糖不足以满足机体一天的需求（表 21-1）。机体在一夜未进食后，机体内胰高血糖素分泌增加，胰岛素分泌下降。它们的共同作用促使脂肪酸从脂肪组织中释放出来（节 19-5）。同时，胰岛素的减少也抑制了肌肉组织对葡萄糖的吸收。因此，肌肉为了产能从葡萄糖转向脂肪酸代谢，这一适应性使葡萄糖节省下来供脑等无法以脂肪酸为燃料的组织使用。

表 21-1　正常 70kg 男人的燃料贮备

燃　　料	质量/kg	卡路里[a]
组织		
脂肪(脂肪三酰甘油)	15	141 000
蛋白质(主要是肌肉)	6	24 000
糖原(肌肉)	0.150	600
糖原(肝)	0.075	300
循环燃料		
葡萄糖(胞外体液)	0.020	80
游离脂肪酸(血浆)	0.0003	3
三酰甘油(血浆)	0.003	30
总计		166 013

[a]1(dieter's)卡路里 = 1 kcal = 4.184 kJ.

引自 Cahill G.E.Jr. *New Engl.J.Med*.282,669(1970)。

糖异生作用可为饥饿状态下的机体提供葡萄糖

机体在停止进食一段时间后,肝脏中储存的糖原被耗尽(图 21-20),在这种情况下,糖异生的速率增加。机体在停止进食 40 小时后,糖异生提供的葡萄糖占肝脏产糖量的 96%。在动物中,葡萄糖不能由脂肪酸合成,这是因为作为糖异生的前体物质,无论是丙酮酸还是草酰乙酸,都不能由乙酰 CoA 净合成。因此,在饥饿状态下,葡萄糖只能由三酰甘油的降解产物甘油或者更重要是由蛋白水解产生的氨基酸来提供,此处的蛋白绝大部分来自于肌肉组织。然而,肌肉的降解当然不能持续不断地进行下去,因为肌肉质量的损失最终会妨碍动物的运动,从而妨碍其觅食的正常进行。因此,机体必须对代谢过程进行统筹安排。

687

经过几天的饥饿,肝脏会促使来源于脂肪酸 β 氧化的乙酰 CoA 合成酮体(节 19-3)。随后,这些燃料释放到血液中,大脑通过合成降解酮体所需要的相应酶类,逐渐适应以酮体为燃料。例

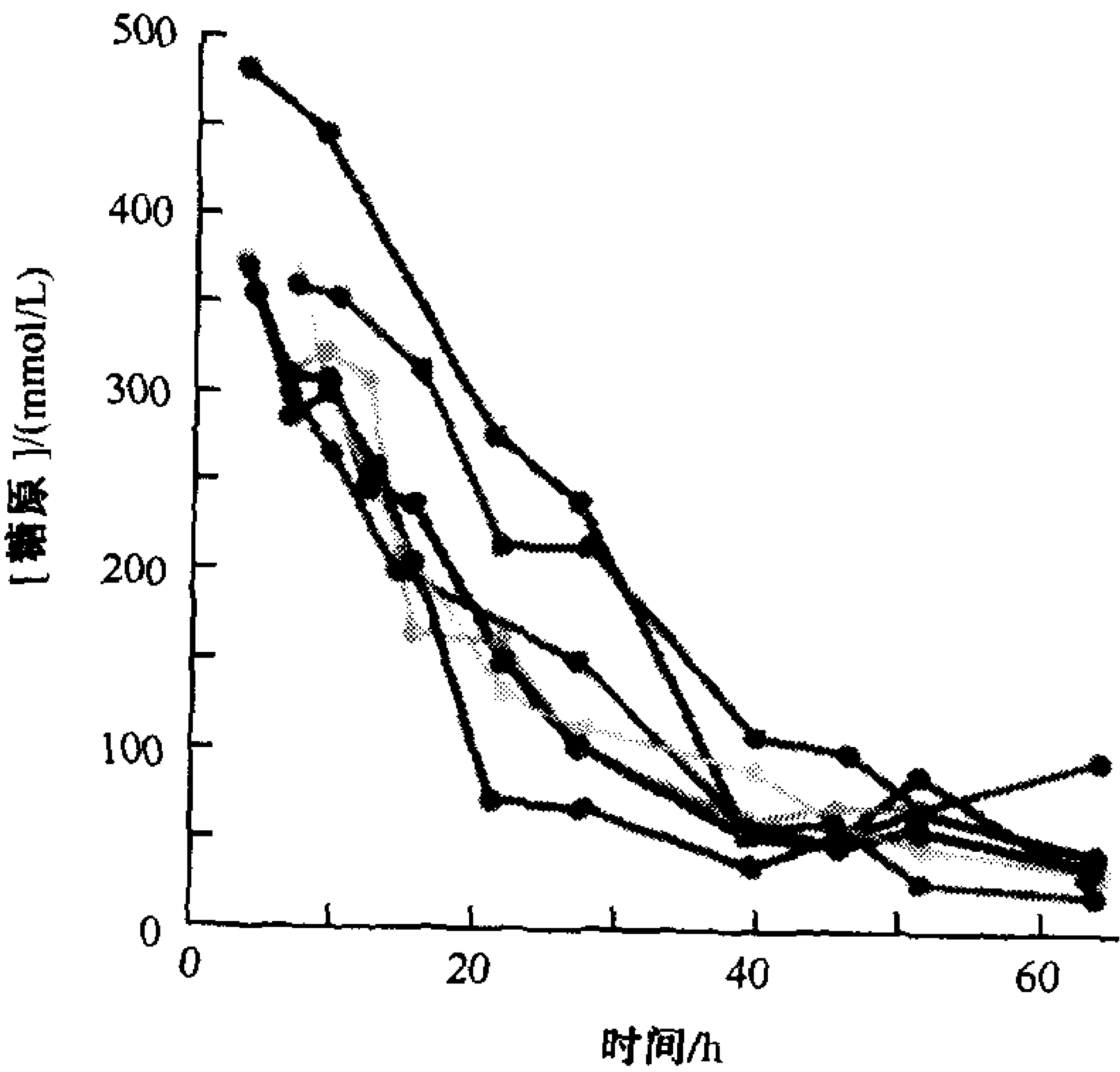


图 21-20　肝脏糖原在机体未进食情况下的消耗情况

在机体保持 64 小时未进食的情况下,7 个个体肝脏糖原含量通过^{13}C NMR 得到测量。[引自 Rothman, D. L., Magnusson, I., Katz, L.D., Shulman, R.G., and Shulman, G.I., *Science* 254, 575 (1991)]

如,机体在 3 天未进食后,大脑的能量需求仅有 1/3 由酮体来提供。但在饥饿 40 天后,却有 70%的能量要靠酮体提供。因此,在长时间饥饿过程中肌肉的降解速率大约会下降到饥饿几天时速率的 25%。也就是说,一个饥饿个体的存活时间更多的是依赖它的脂肪库的大小而不是其肌肉的质量。事实上,高度肥胖的个体可在不进食的情况下存活一年甚至更长的时间(人们已在临床监测的减肥计划中这样做了)。

B. 糖尿病

糖尿病(diabets mellitus)在美国是第三大死亡诱因,仅次于心脏病和癌症。这种病症是由于胰岛素分泌不足或胰岛素不能有效刺激其靶细胞引起的。因而,糖尿病患者的血糖浓度剧烈上升,甚至于葡萄糖"溢出"血液进入尿中,这也为糖尿病提供了一种便捷的诊断手段。然而,尽管血糖水平很高,患者的细胞仍处于"饥饿"状态中,因为胰岛素刺激葡萄糖进入细胞的机制缺损。为了补充细胞能量之需,三酰甘油的水解过程、脂肪酸氧化、糖异生作用以及酮体的生成均被加快。在一种称为**酮血症**(ketosis)的疾病中,血中酮体的水平异常高。由于酮体是酸性的,其浓度的升高加重了血液的缓冲负担和肾脏的负担,后者通常负责通过将多余的 H^+ 排入尿中来调节血液的 pH 值。H^+ 的排泄伴随着 Na^+、K^+、P_i 和 H_2O 的排泄,导致机体严重脱水(过分口渴是糖尿病的一个典型症状),血液体积减少,最终危及生命。

糖尿病有两种主要形式:

1) **胰岛素依赖性糖尿病 / 青少年糖尿病**(通常在幼年时期突然发作)。
2) **非胰岛素依赖性糖尿病 / 成年人糖尿病**(通常在 40 岁后逐渐形成)。

胰岛素依赖性糖尿病是由于胰腺 β 细胞缺乏引起的

胰岛素依赖性(I 型)糖尿病中,胰岛素缺乏或接近缺乏,这是因为病人缺乏 β 细胞或具有缺陷的 β 细胞。这种情况通常是由于人体的自身免疫反应引起的,有选择地破坏了胰腺 β 细胞。正如 Fredrick Banting 和 Charles 在 1921 首次证明的那样,I 型糖尿病患者需要依赖每天注射胰岛素存活下来,同时还必须严格控制饮食平衡,并进行一定量的运动。然而,即便如此,很明显由于周期性胰岛素注射引发的不精确代谢控制引起退行性并发症,例如,肾功能失调、神经损伤以及心血管疾病,患者的寿命与正常寿命相比将减少 1/3。糖尿病表现出来的**高血糖**(hyperglycemia,高的葡萄糖浓度)还会引发失明,因为高血糖会使视网膜退化,晶状体蛋白糖酰化,从而诱发白内障。

688

通常胰岛素依赖性糖尿病综合症的快速发作似乎暗示了自身免疫攻击胰腺 β 细胞的周期短。然而,该病症的发展通常经历数年时间,因为免疫系统对 β 细胞的破坏是缓慢的,而只有当大于 80% 的 β 细胞被消灭时糖尿病的典型症状才可能突然出现。

非胰岛素依赖性糖尿病可能是由于胰岛素受体缺乏引起的

非胰岛素依赖性(II 型)糖尿病,在已诊断的糖尿病病例中占 90%,它影响 18%的 65 岁以上人群的健康,通常出现在带有遗传基因的肥胖人群中。这些患者通常有正常甚至较高的胰岛素水平,他们的症状可能是由正常的响应胰岛素的细胞上胰岛素受体缺乏或异常引起的。由于这些细胞不能对胰岛素作出正常响应,因而被称为**胰岛素抗性**(insulin resistant)。结果,患者血糖浓度要大大高于正常人,特别是在进食后(图 21-21)。

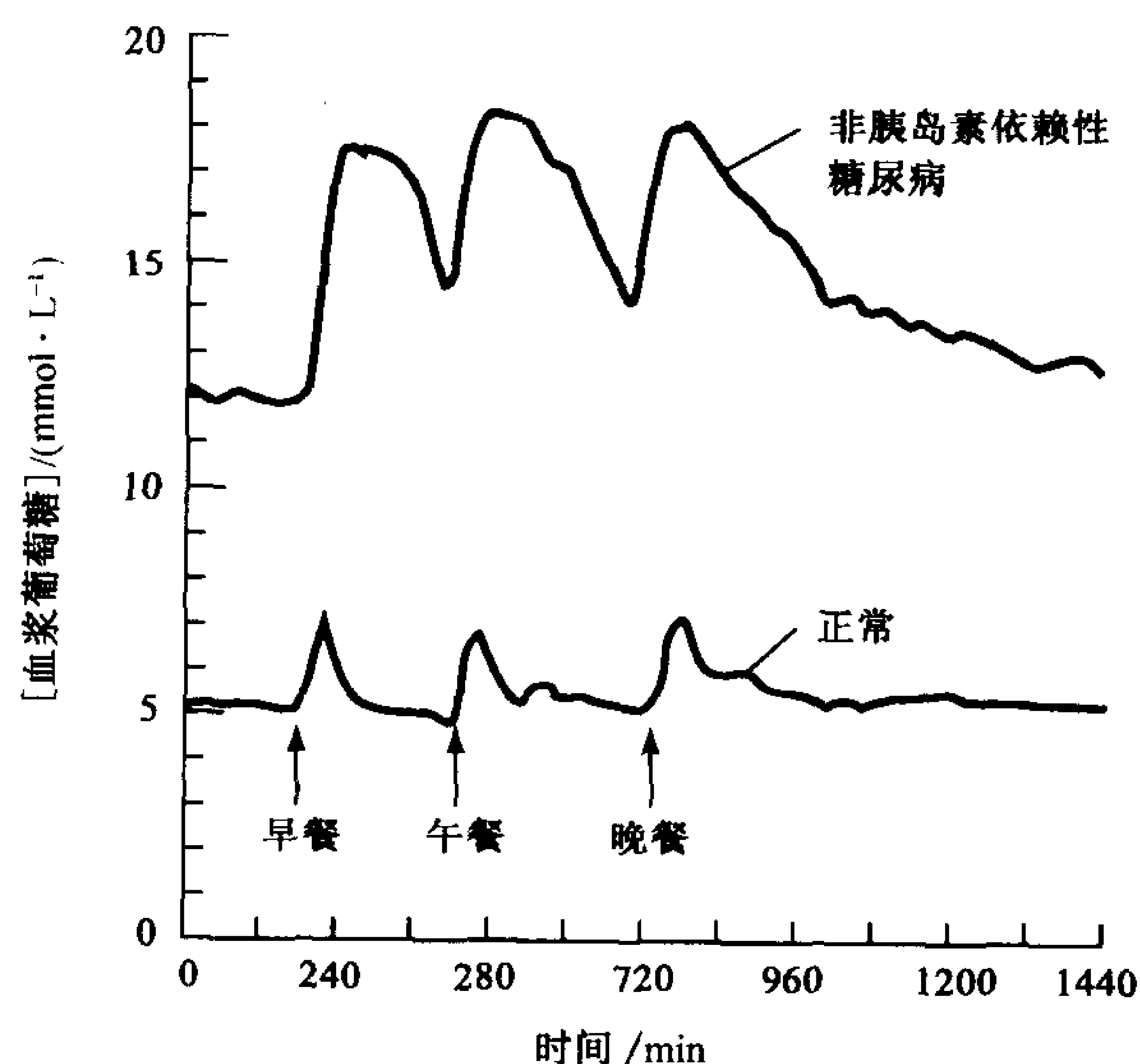


图 21-21　正常与非胰岛素依赖性糖尿病个体中,血浆葡萄糖浓度在 24 小时中的变化情况
如图所示,在糖尿病个体中,葡萄糖浓度不论是基准水平还是进餐后的峰值都比正常个体要高得多。[引自 Bell, G. I., Pilkis, S. J., Weber, I. T., and Polonsky, K. S., *Annu. Rev. Physiol*. 58, 178(1996)]

伴随着胰岛素抗性出现的高血糖促使胰腺 β 细胞提高其胰岛素的分泌量。然而,胰岛素分泌的高基准水平将减弱 β 细胞对血糖进一步增加的反应能力。由于这个原因,随着时间的推移,机体高血糖及其并发症将愈发严重。

胰岛素受体的大量变异与非胰岛素依赖性糖尿病有关。这些缺陷或者改变了受体与胰岛素的结合(α 亚基突变),或者改变了 Tyr 激酶的活性(β 亚基突变)。然而,遗传缺陷大约只占非胰岛素依赖性糖尿病的 5%,因此,很有可能有许多因素参与了该病症的发展过程。例如:过度饮食造成的胰岛素分泌量的增加可能最终抑制胰岛素受体的合成。这一假说解释了为什么单靠节食也可以缓解糖尿病。

689

非胰岛素依赖性糖尿病的一种罕见形式——**MODY**(maturity-onset diabetes of the young)通常在 25 岁之前出现,它是葡糖激酶突变的结果,这一形式的糖尿病以显性的方式遗传。通常,由酶缺陷引发的疾病是以隐性的方式传递的,因为个体通常可以耐受下降了 50% 的酶活性。然而,对葡糖激酶而言,若其活性下降 50%,机体的燃料代谢将受到严重的影响。事实上,这也强有力地证明了葡糖激酶是不可缺少的酶,它将胰岛素释放与葡萄糖供给协调起来(见框 21-3)。

C. 肥胖症

人体在一个相对狭小的范围内调节糖原和蛋白质的水平,但比它们大得多的脂肪库可以变得很大。脂肪的过多摄入(相对脂肪氧化而言)在很大程度上会使脂肪酸以三酰甘油的形式聚集在脂肪组织中。虽然来自于糖的乙酰 CoA 可以用来合成脂肪酸,但对许多饮食中含有丰富脂肪的美国人而言,这并不是脂肪酸最主要的来源。只有当糖摄入过多,以至于通常情况下储存多余糖的糖原库再也无法承受时,糖才开始用于脂肪的合成。

框 21-3 生物化学焦点

β细胞怎样响应血糖水平的？

在正常人中，胰腺通过分泌胰岛素响应血糖浓度的升高。胰腺β细胞对处于 5.5～6.0 $mmol \cdot L^{-1}$ 之间（正常血糖浓度为 3.6～5.8 $mmol \cdot L^{-1}$）的血糖浓度最敏感。现今没有证据可以证明细胞表面具有葡萄糖"受体"，它可以将信号传导至β细胞中的分泌装置。事实上，葡萄糖不能作为一种"激素"，因为β细胞含有 GLUT2，一个高 K_M 值的葡萄糖转运蛋白，它也存在于肝脏中。也就是说，葡萄糖很容易进入β细胞，细胞在一定程度上可依据血浆中葡萄糖的浓度来决定转运的速率。进入β细胞的葡萄糖的代谢产生了引发胰岛素分泌的信号。

β细胞葡萄糖代谢的限速步骤是由葡糖激酶（与肝细胞中出现的酶相同）催化的反应。由于这个原因，葡糖激酶被认为是葡萄糖的"感受器"。在β细胞中，G6P 没用来合成糖原，同时细胞中磷酸戊糖途径不活跃，而且乳酸脱氢酶的活性也很低。结果，所有葡糖激酶反应产生的 G6P 基本上被降解成丙酮酸，然后转化为乙酰 CoA 进入柠檬酸循环被进一步氧化。葡萄糖这一单向的、线性的分解代谢途径将β细胞的氧化磷酸化速率与可提供的葡萄糖的数量直接联系起来。通过一个至今尚未完全了解的机制，呼吸作用的整体水平可以调节胰岛素的合成与分泌。

葡糖激酶活性的部分丧失也会导致糖尿病的产生，这一事实预示着葡糖激酶在胰岛素分泌途径中起"门卫"的作用。线粒体内的生理过程（例如，胞质中一些等价的还原物质转运到线粒体或 ATP 合成酶的运作）参与胰岛素的产生，这一论断可以由以下事实得到证明：随着年龄的增长，线粒体的氧化能力下降（节 15-7B）与年龄依赖性的非胰岛素依赖性糖尿病的爆发有关。很有可能胰岛素长期分泌过多，恰好反应了年老细胞无法很好的调节胰岛素的产生。这同时也解释了为什么许多非胰岛素依赖性糖尿病与胰岛素受体突变无关。

脂肪消耗与利用长期的不平衡会增加脂肪组织的质量，使脂肪细胞的数目增加，体积变大（脂肪细胞一旦形成，不会无故消失，但它们的大小却是可以增加或减少的）。随着脂肪组织质量的增加，可以用于产能的脂肪库也同时增加了，最后可以达到一个稳定的状态，在该状态中脂肪组织的质量不再增加，同时脂肪的储存也通过脂肪代谢达到一个动态的平衡。对人类和动物的研究表明，机体脂肪含量的百分比大致与饮食中脂肪含量相当。这一现象部分说明了富裕国家中高脂食品丰富，其肥胖发生的几率也相对较高的原因。大量证据表明个体的行为（例如饮食习惯和运动水平）会影响机体的构成。然而，一些肥胖的发生显然也是机体天生功能失调（如机体分解燃料的功能失调）的结果。

690

肥胖症的遗传学基础

许多动物，包括人在内，倾向于拥有相对稳定的体重。也就是说，如果提供给他们自由进食的机会，他们大多只摄入足够维持其"基准"体重的食物。然而，有这样一种小鼠，它们是 *obese* 基因缺陷的纯合体（即 *ob/ob* 型小鼠），它们的体重是正常小鼠（OB/OB，图 21-22）体重的两倍甚至更多。若提供给它们无限量的食物，它们通常会过多地摄入。这种小鼠缺乏 leptin（希腊语：*leptos*，瘦的）蛋白——*obese* 基因的产物。leptin 是一种 16 kDa 的多肽，通常由脂肪细胞产生（图 21-23）。将 leptin 注射入 *ob/ob* 小鼠中，它们的食物摄入量会减少，同时体重下降。因此，leptin 被认为是一个"过饱"的信号，它可以影响脑的胃口调控系统。

ob/ob 小鼠肥胖的简单遗传学基础似乎不适用于多数的肥胖人群，人体中 leptin 水平随机体脂肪百分含量的上升而增加，同时与脂肪细胞 leptin 的合成保持一致。因此，人类肥胖似乎不

图 21-22　正常(OB/OB,左)和肥胖(*ob/ob*,右)的小鼠

(引自 Richard D. Palmiter, University of Washinton.)

图 21-23　人类 leptin-E100 的 X 射线结构

突变形式的 leptin(Trp 100 ⟶ Glu)与野生型蛋白的生理活性类似,但前者的晶体相对而言比较容易得到。leptin 的残基包装成 4 个 α 螺旋(依次标记为 A 至 D)。A 的二硫键(其原子用绿色与黄色表示)将 Cys 146 与 Cys 96 连接在一起。(引自 Faming Zhang, Eli Lilly and Co., Indianapolis, Indiana.)

是 leptin 蛋白缺乏的结果,而是由于"leptin 抗性"的产生、脑中 leptin 受体水平下降或运送 leptin 通过血脑屏障进入神经系统的机制发生故障而产生的。

对 leptin 的反应减弱会导致**神经肽 Y**(neuropoptide Y)浓度的升高。神经肽 Y 含有 36 个氨基酸残基,是由**下丘脑**(hypothalamus)释放的。下丘脑是脑的一部分,它控制机体许多的生理功能。神经肽 Y 可以激起食欲,促使胰岛素的分泌,从而导致脂肪的积累。由此产生的长期的高血糖会导致胰岛素抗性的形成,最终爆发非胰岛素依赖性糖尿病(节 21-4B)。1994 年 leptin 的发现解释了食欲与肥胖之间的关系。虽然 leptin 信号转导途径还未了解清楚,但却预示了在肥胖症状不能控制的情况下,它可能是一个有潜力的治疗思路。

1 Tyr—Pro—Ser—Lys—Pro—Asp—Asn—Pro—Gly—Glu(10)—Asp—Ala—

Pro—Ala—Glu—Asp—Met—Ala—Arg—Tyr(20)—Tyr—Ser—Ala—Leu—

Arg—His—Tyr—Ile—Asn—Leu(30)—Ile—Thr—Arg—Gln—Arg—Tyr(36)—NH_2

神经肽 Y 的氨基酸序列

小　　结

1. 主要代谢燃料(葡萄糖、脂肪酸和氨基酸)合成和降解的途径汇聚在乙酰 CoA 和丙酮酸处。在哺乳动物中,这些途径的流向是组织特异性的。
2. 脑以葡萄糖为其主要的代谢燃料。肌肉可以氧化一系列不同的燃料,但要发挥最大的功效却要依赖于厌氧的糖酵解过程。脂肪组织以三酰甘油的形式储存多余的脂肪酸,并在必要时将它们动员出来。
3. 肝脏能够维持循环系统中燃料的浓度。葡糖激酶使肝脏能够吸收多余的葡萄糖,并将它们用于不同的代谢途径中去。同时,肝脏也能将脂肪酸转化为酮体,并对来自于食物或蛋白水解的氨基酸进行代谢。
4. Cori 循环和葡萄糖-丙氨酸循环是多器官间代谢途径,通过这些途径,肝脏可以与肌肉交换一些代谢中间产物。
5. 转运蛋白 GLUT 家族调节葡萄糖进出细胞的通路。肝中 GLUT2 具有高的 K_M 值使它能响应宽范围的葡萄糖浓度。GLUT4 是肌肉和脂肪组织中响应胰岛素的葡萄糖转运蛋白。
6. 激素通过与其相应受体的结合将调节信号转导至靶细胞。这一过程中,受体负责将信号由胞外传递至细胞内部。参与哺乳动物燃料代谢的主要激素是胰岛分泌的胰岛素和胰高血糖素,肾上腺分泌的肾上腺素和去甲肾上腺素。
7. 腺苷酸环化酶信号传导系统由一个受体、一个异三聚体 G 蛋白、腺苷酸环化酶和 cAMP 依赖性蛋白激酶构成,G 蛋白可以抑制或激活腺苷酸环化酶。
8. 受体酪氨酸激酶(如胰岛素受体)可以响应配体的结合,使特定的氨基酸残基磷酸化。
9. 在磷酸肌醇途径中,激素的结合导致磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP_2)水解成可以打开 Ca^{2+} 通道的肌醇-1,4,5-三磷酸(IP_3)和可以激活蛋白激酶 C 的二酰甘油(DG)。
10. 在饥饿状态下,当无可提供的食物燃料时,肝脏首先通过糖原降解释放葡萄糖,然后以氨基酸为前体物质进行糖异生作用。最后,脂肪酸降解提供的酮体满足机体的大部分能量需求。
11. 糖尿病会产生高血糖和其他一些生理障碍,这些现象的产生可能是由于可产生胰岛素的胰腺 β 细胞的破坏或细胞对胰岛素产生了抗性(缺乏胰岛素受体)。
12. 肥胖是由于脂肪摄入与脂肪氧化之间的平衡遭到破坏而引起的,它可能具有遗传学和行为学上的原因。

参 考 文 献

燃烧代谢

Bell, G.I., Pilkis, S.J., Weber, I.T., and Polonsky, K.S., Glucokinase mutations, insulin secretion, and diabetes mellitus, *Annu. Rev. Physiol.* **58,** 171–186 (1996).

Flatt, J.-P., Use and storage of carbohydrate and fat, *Am. J. Clin. Nutr.* **61**(suppl.), 952S–959S (1995). [A concise review of fuel metabolism and the development of obesity.]

Gould, G.W. and Holman, G.D., The glucose transporter family: structure, function and tissue-specific expression, *Biochem. J.* **295,** 329–341 (1993).

Hamann, A. and Matthaei, S., Regulation of energy balance by leptin, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **104,** 293–300 (1996).

Lissner, L. and Heitmann, B.L., Dietary fat and obesity: evidence from epidemiology, *Eur. J. Clin. Nutr.* **49,** 79–90 (1995).

Matchinsky, F.M. and Collins, H.W., Essential biochemical design features of the fuel-sensing system in pancreatic β cells, *Chem. Biol.* **4,** 249–257 (1997).

Sacks, D.B. and McDonald, J.M., The pathogenesis of type II diabetes mellitus: a polygenic disease, *Am. J. Clin. Pathol.* **105,** 149–156 (1996).

信号转导

Barford, D., Protein phosphatases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5,** 728–734 (1995).

Hamm, H.E. and Gilchrist, A., Heterotrimeric G proteins, *Curr. Opin. Cell Biol.* **8,** 189–196 (1996).

Nishizuka, Y., Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C, *Science* **258,** 607–614 (1992).

Pawson, T., Protein modules and signalling networks, *Nature* **373,** 573–579 (1995). [Provides an overview of the proteins involved in signaling via protein tyrosine kinases.]

Sprang, S.R., G protein mechanisms: Insights from structural analysis, *Annu. Rev. Biochem.* **66,** 639–678 (1997).

Taussig, R. and Gilman, A.G., Mammalian membrane-bound adenylate cyclases, *J. Biol. Chem.* **270,** 1–4 (1995).

White, M.F. and Kahn, C.R., The insulin signaling system, *J. Biol. Chem.* **269,** 1–4 (1994).

关　键　词

Cori 循环　Cori cycle
体内平衡　homeostasis
脱敏作用　desensitization
交流　cross talk
氧债　oxygen debt
胰岛　islets of Langerhans
生长因子　growth factor
糖尿病　diabetes
葡萄糖-丙氨酸循环　glucose-alanine cycle
肾上腺素能受体　adrenergic receptor
酪氨酸激酶　tyrosine kinase
酮解　ketosis
激素　hormone
异三聚体 G 蛋白　heterotrimeric G-protein
自磷酸化　autophosphorylation
高血糖　hyperglycemia
受体　receptor
GTP 酶　GTPase
磷酸肌醇途径　phosphoinositide pathway
胰岛素抗性　insulin resistance
信号转导　signal transduction

学习思考题

1. 总结脑、肌肉、脂肪组织和肝脏中燃料代谢的主要特征。
2. 请解释为什么葡糖激酶高的 K_M 值对于肝脏缓冲血糖浓度变化的功能极为重要。
3. 试述 Cori 循环和葡萄糖-丙氨酸循环的运作过程。
4. 为什么不同组织具有的葡萄糖转运蛋白——GLUT 家族的成员不同?
5. 分别讨论腺苷酸环化酶、受体激酶和磷酸肌醇途径参与的信号转导途径中各组分的活性。
6. 异三聚体 G 蛋白是如何工作的?
7. 试述饥饿状态下机体的代谢变化。
8. 比较胰岛素依赖性和非胰岛素依赖性糖尿病的区别。
9. 肥胖症是如何与非胰岛素依赖性糖尿病相关的?

练　习　题

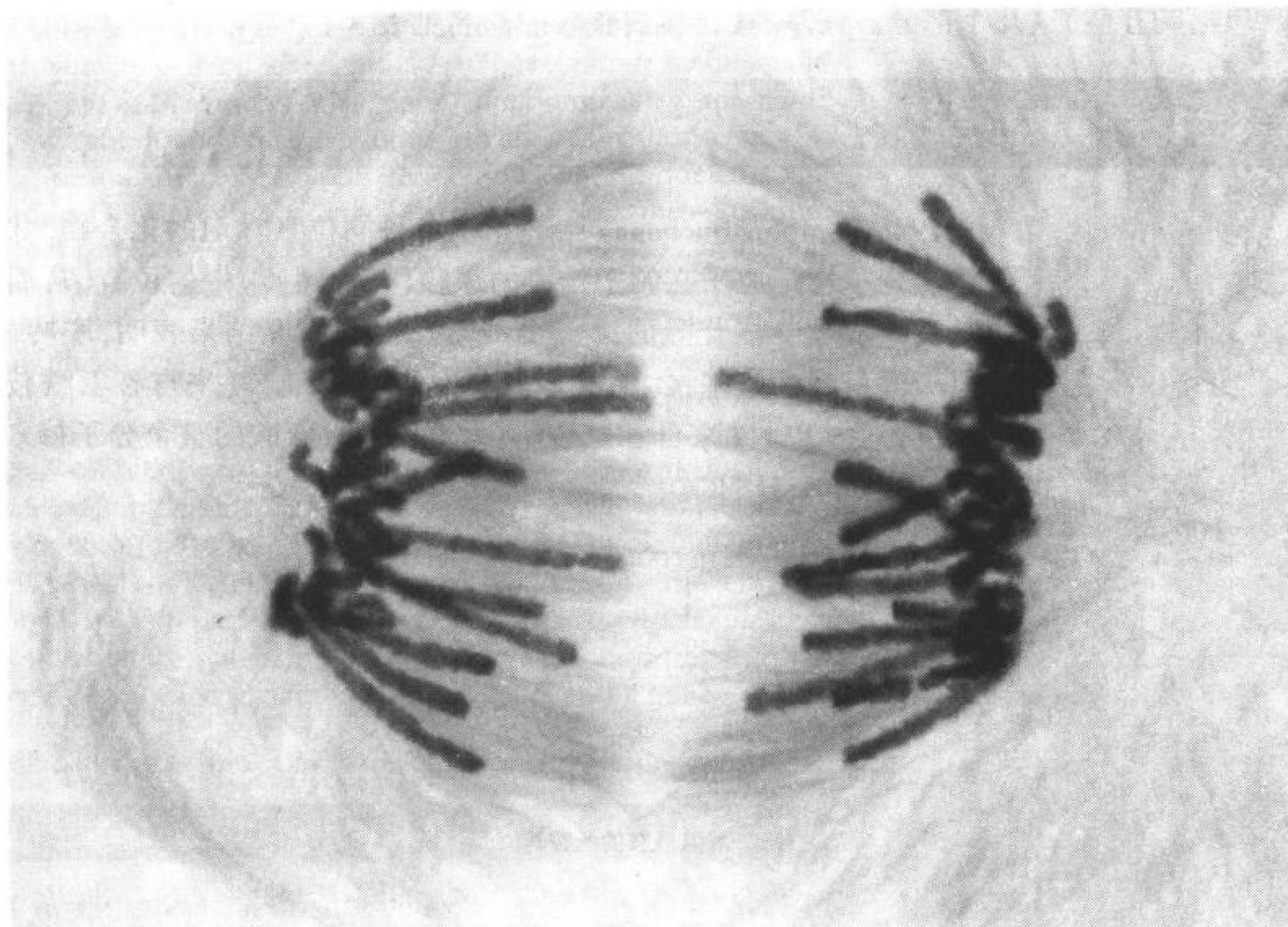
1. 试问对一正常人的大脑施用过多的胰岛素会产生什么样的后果?
2. 为什么当细胞中 ATP 供给殆尽时,产生 ATP 的氧化代谢也停止了?
3. 当配体的总浓度为 $2\mu mol \cdot L^{-1}$,受体的总浓度为 $0.3\mu mol \cdot L^{-1}$,K 值为 $1\times10^{-6} mol \cdot L^{-1}$时,结合有配体的受体的百分比是多少?
4. 试问水解困难的 GTP 类似物 GTPγS(末端磷酸基团的一个氧原子被硫原子取代)是如何影响腺苷酸环化酶产生 cAMP 的?
5. 含有完全相同脂肪酰残基的磷脂酰乙醇胺和 PIP_2 可被一特定的磷脂酶 C 以相同的速率水解。试问其水解产物对蛋白激酶 C 的影响是否相同? 请解释原因。
6. 一种生长因子通过对受体酪氨酸激酶的作用促使细胞分裂。请试预测一种抑制蛋白酪氨酸磷酸酶的病毒蛋白对该过程的影响。
7. 请解释为什么脂肪细胞由脂肪酸合成三酰甘油需要胰岛素的参与?
8. 有经验的运动员知道在临跑马拉松之前摄入大量的葡萄糖是个不好的习惯。请解释这一表面上看似矛盾的现象的代谢机理。

9. 在若干天饥饿后，肝脏通过柠檬酸循环对乙酰 CoA 进行代谢的能力大大下降，试解释之。

10. 假如将 *ob*/*ob* 小鼠的血液人为地注射入正常小鼠的循环系统中，试问 *ob*/*ob* 小鼠的食欲和体重会发生什么变化？

（清华大学　王希成　译　郑昌学　校）

第 22 章　核苷酸代谢



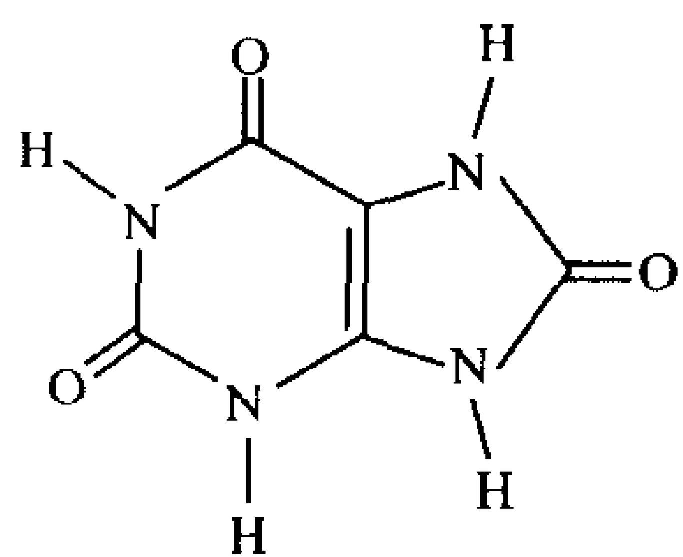
两套完整染色体的合成需要大量新合成的核苷酸。在细胞分裂(有丝分裂)时,两套完全相同的染色体(紫色)被分开。(承蒙 Oregon 大学 Andrew Bajer 的许可)

核苷酸是糖的 C1′连接嘌呤或嘧啶碱基的戊糖(核糖或脱氧核糖)形成的磷酸酯(节 3-1)。核苷三磷酸是作为核酸前体的单体单位,核苷酸也执行许多其他生化功能。例如,我们已知高能化合物如 ATP 的水解能够提供热力学上有利的各种反应所需的自由能。我们也已知道核苷酸

是代谢的重要辅因子，是包括 FAD、NAD^+ 和辅酶 A 的组成成分。几乎所有的细胞都能从头合成(重新合成)或从核酸的降解产物合成核苷酸，由此可见它们在细胞代谢中的重要作用。但是核苷酸不同于糖、氨基酸和脂肪酸，它并不是代谢能量的重要来源。

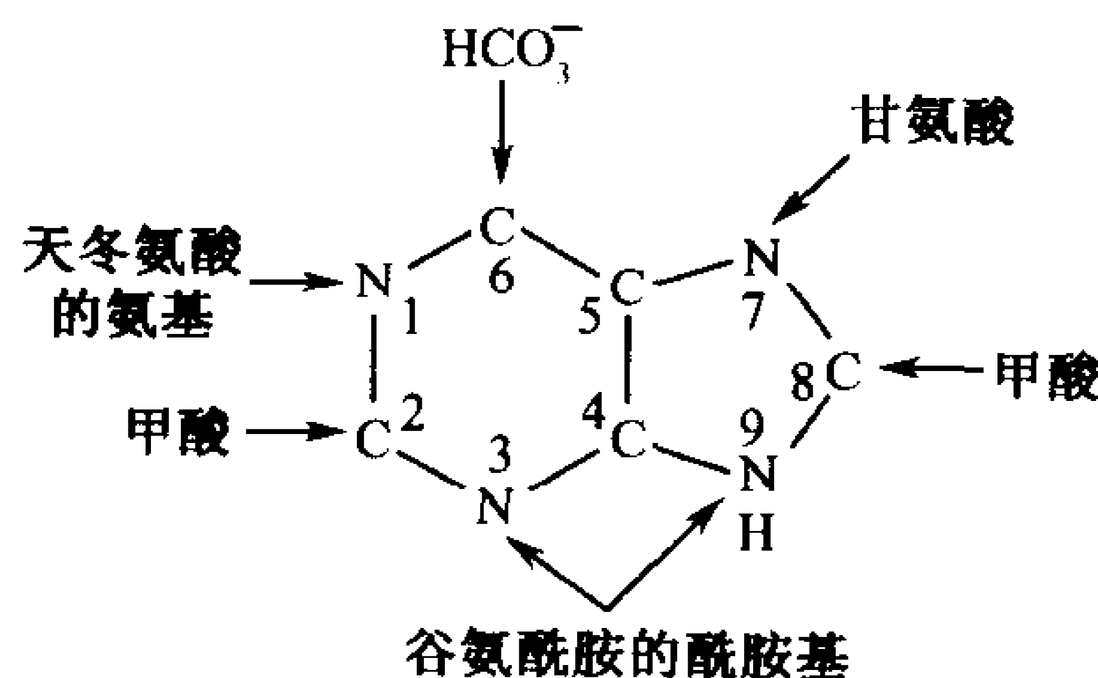
在这章中，我们将论述核苷酸的生物合成途径。同时，我们将讨论它们是怎样被调节的，以及由于基因缺陷和服用化疗试剂使代谢途径受到阻断的后果。然后我们将讨论核苷酸是怎样被降解的。围绕核苷酸代谢这一总的化学主题，我们的讨论将分成嘌呤核苷酸、嘧啶核苷酸和脱氧核苷酸(包括胸苷酸)这几个部分。碱基、核苷和核苷酸的命名见表 3-1。

1. 嘌呤核糖核苷酸的合成

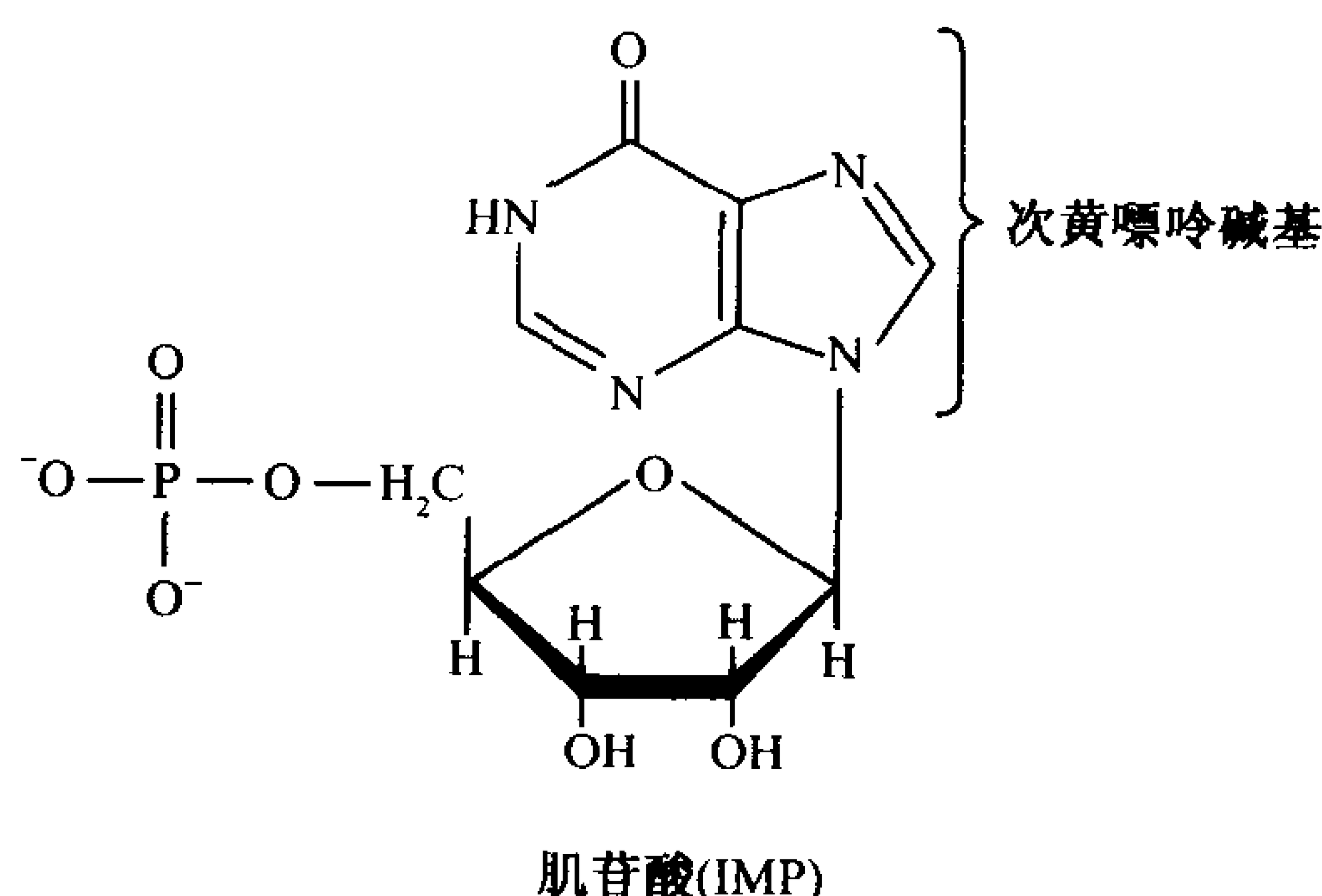


尿酸

1948 年，John Buchanan 给鸽子喂各种同位素标记的化合物，并在化学上测定了标记原子在鸽子排泄的**尿酸**(一种嘌呤)中的位置，从而获得了从头合成嘌呤核苷酸的第一个线索。他的研究结果表明，嘌呤的 N1 来自天冬氨酸的氨基；C2 和 C8 来自甲酸；N3 和 N9 来自谷氨酰胺的酰胺基；C4、C5 和 N7 来自甘氨酸(有力地说明甘氨酸的整个分子掺入到嘌呤环中)；C6 来自 HCO_3^-。



这些前体掺入嘌呤环的真正途径大部分是由 Burchanan 和 G. Robert Greenberg 在随后的研究中阐明的。最初合成的嘌呤衍生物是**肌苷酸**(IMP)，即碱基为**次黄嘌呤**的核苷酸。IMP 是 AMP 和 GMP 的前体。因此，出乎意料的是，*嘌呤最初是以核糖核苷酸而非游离碱基的形式生成*。其他的研究表明，不同的生物体，如大肠肝菌、酵母、鸽子和人都有完全相同的嘌呤核苷酸生物合成途径，这进一步表明生命的生物化学的统一性。



肌苷酸(IMP)

695

A. 肌苷酸的合成

IMP 是通过一个包括 11 步反应的途径合成的(图 22-1)：

1) 核糖-5-磷酸的活化

嘌呤生物合成的起始物是 α-D-核糖-5-磷酸，它是磷酸戊糖途径的产物(节 14-6)。在嘌

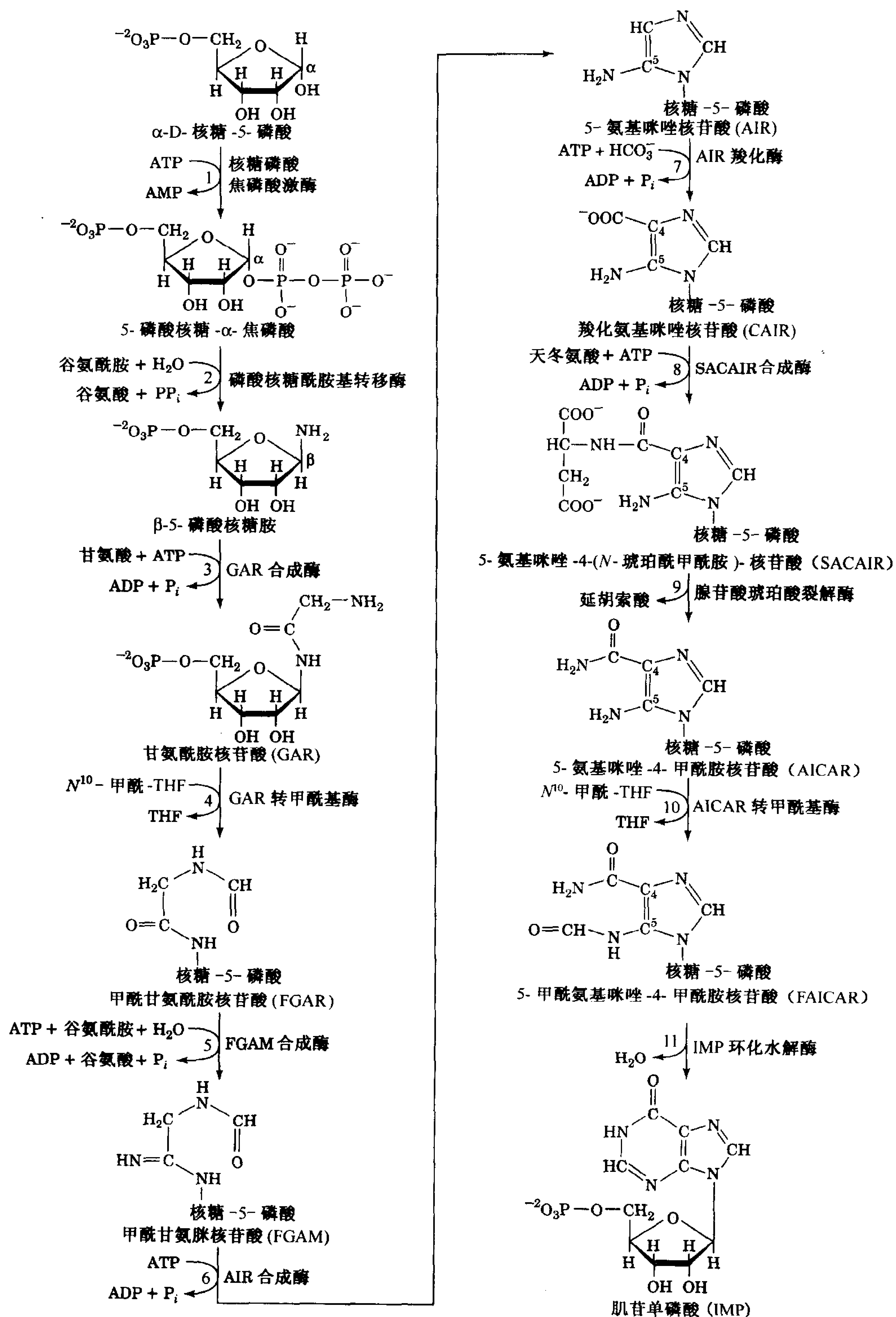


图 22-1　代谢的秘诀：IMP 从头合成的代谢途径

这里嘌呤基是在核糖环的基础上，通过 11 步酶促反应生成。

呤生物合成的第一步中,**磷酸核糖焦磷酸激酶**通过催化核糖-5-磷酸与 ATP 反应,生成**5-磷酸核糖-α-焦磷酸**(PRPP),从而激活核糖。PRPP 也是嘧啶核苷酸(节 22-2A)和组氨酸、色氨酸(节 20-5B)生物合成的前体。作为一个在生物合成交叉点上如此重要的酶,它的活性是受到严格调节的。

2) 嘌呤 N9 原子的获得

在嘌呤生物合成特有的第一步反应中,**磷酸核糖焦磷酸转酰胺酶**催化谷氨酰胺的酰胺氮原子置换 PRPP 的焦磷酸基团。该反应伴随着 PRPP C1 的 α-构型的转变,形成**β-5-磷酸核糖胺**,并决定了以后核苷酸的异头形式。这个通过随后释放 PP_i 水解而驱动完成的反应,是这个途径流量的控制步骤。

3) 嘌呤 C4、C5 和 N7 原子的获得

甘氨酸的羧基与磷酸核糖胺的氨基形成酰胺,生成**甘氨酰胺核苷酸**(GAR)。这个反应尽管伴随 ATP 水解成 ADP 和 P_i,但它是可逆的。这步反应是嘌呤生物合成途径中惟一得到多个嘌呤环原子的一步。

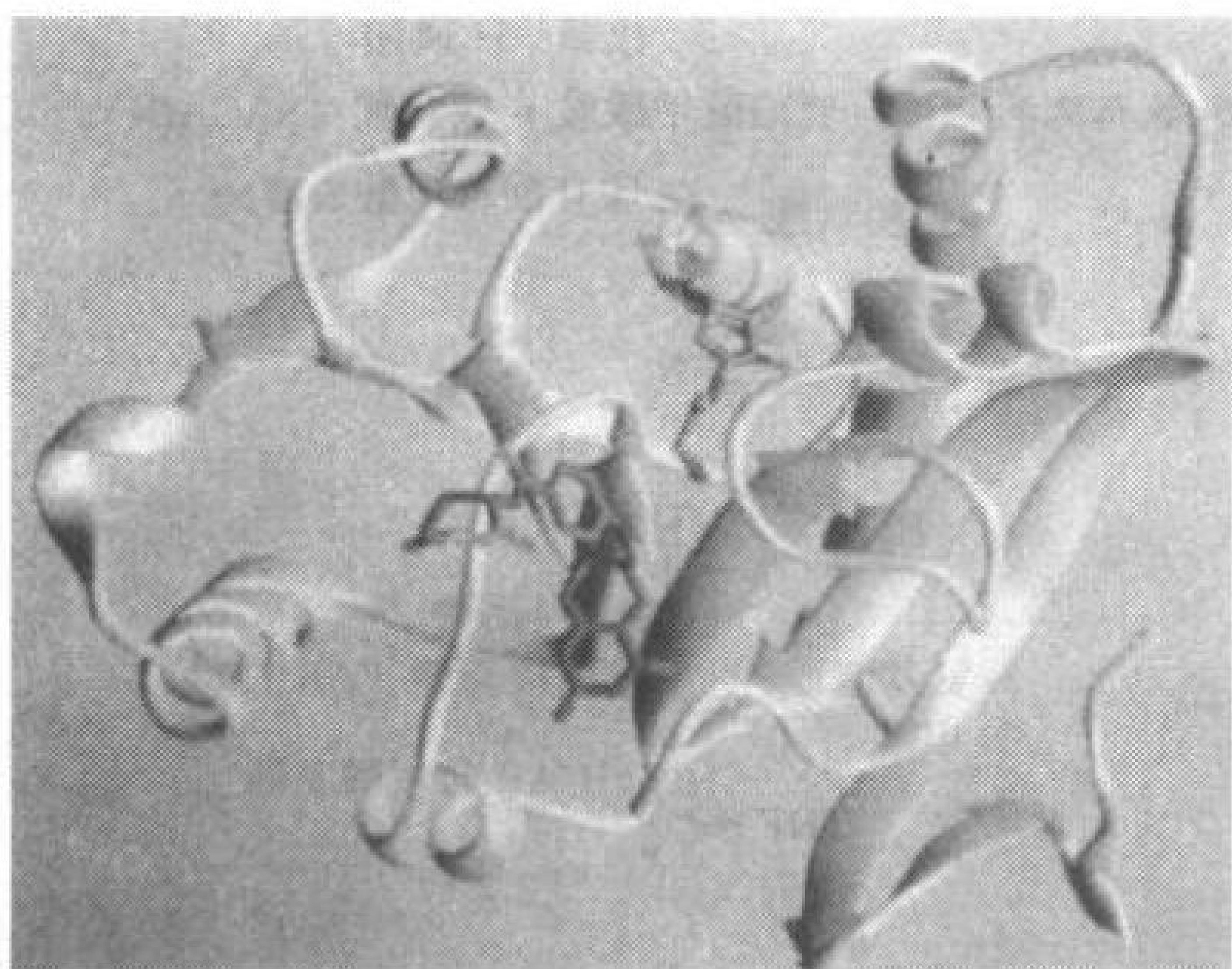


图 22-2 大肠杆菌 GAR 转甲酰基酶的一个亚基的带状图

该酶与 GAR(右上方)和 5dTHF(左下方)形成复合物,GAR 和 5dTHF 的碳原子分别为青色和绿色,而它们的氮原子、氧原子和磷原子分别为蓝色、红色和黄色。(根据 Robert Almassy 的 X 射线结构)

697

4) 嘌呤 C8 原子的获得

GAR 的游离 α-氨基被甲酰化,生成**甲酰甘氨酰胺核苷酸**(FGAR)。在这个反应中的甲酰基供体是 N^{10}-甲酰-四氢叶酸(N^{10}-formyl-THF),它是转移 C1 单位的辅酶(THF 辅因子已在节 20-4D 中叙述过)。Robert Almassy 测定了催化这一反应的酶,即 **GAR 转甲酰基酶**和 GAR、以及 THF 类似物 **5-脱氮四氢叶酸**(5dTHF)复合物的 X 射线结构(图 22-2)。注意,GAR 的氨基与 5dTHF 的 N10 邻近,这支持了酶学的研究结果,即 GAR 转甲酰基酶催化的反应是经由 GAR 的氨基对 N^{10}-甲酰-THF 的甲酰碳亲核攻击,生成一个四面体的中间物。

5) 嘌呤 N3 原子的获得

第二个谷氨酰胺的酰胺氨基被转移到正在形成中的嘌呤环上,生成**甲酰甘氨咪核苷酸**(FGAM)。这反应通过与 ATP 水解成 ADP 和 P_i 偶联而驱动。

6) 嘌呤咪唑环的生成

嘌呤咪唑环是通过需 ATP 的分子内缩合而闭环的,生成 **5-氨基咪唑核苷酸**(AIR)。咪唑环的芳构化是通过反应物从它的亚胺形式到烯胺形式的互变异构转移促成的。

7) C6 的获得

嘌呤的 C6 是由 **AIR 羧化酶**催化,生成**氨基咪唑羧酸核苷酸**(CAIR)的反应中,以 HCO_3^- 形式被引进。大肠杆菌的 AIR 羧化酶由 **PurE** 和 **Purk** 两个蛋白质组成,虽然 PurE 单独

能催化羧化反应，但它对 HCO_3^- 的 K_M 大约是 110 mmol·L^{-1}，因此这个反应需要非生物性、很高的 HCO_3^- 浓度（约 100mmol·L^{-1}）才能进行，PurK 以 ATP 水解为代价，降低 PurE 反应所需的 HCO_3^- 浓度约 1000 倍以上。

8）N1 的获得

嘌呤的 N1 是由天冬氨酸在酰胺形成的缩合反应中提供的。此反应生成 **5-氨基咪唑-4-（*N*-琥珀酰甲酰胺）-核苷酸**（SACAIR）。该反应由 ATP 的水解驱动，化学上类似于反应 3。

9）延胡索酸的去除

随着延胡索酸的释放，SACAIR 断裂生成 **5-氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸**（AICAR）。反应 8 和反应 9 在化学上与尿素循环中瓜氨酸被胺化、生成精氨酸相似（节 20-3A）。在这两条途径中，天冬氨酸的氨基都是通过 ATP 驱动的偶联反应而转移到受体上，接着天冬氨酸的碳骨架以延胡索酸的形式被除去。

10）C2 的获得

最终的嘌呤环原子是通过 N^{10}-甲酰-四氢叶酸的甲酰化获得的，生成 **5-甲酰氨基咪唑-4-甲酰胺核苷酸**（FAICAR）。该反应和嘌呤生物合成的反应 4 都间接被**磺胺**抑制，磺胺是 THF 的组成成分，对氨基苯甲酸的结构类似物（节 20-4D）。

11）环化生成 IMP

嘌呤生物合成途径的最终反应，即闭环形成 IMP，是通过脱水作用完成的。与反应 6 环化形成咪唑环不同，该反应不需要 ATP 的水解。

B. 腺嘌呤和鸟嘌呤核糖核苷酸的合成

698

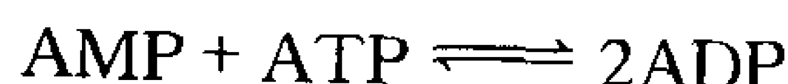
IMP 并不在细胞中积累，而是迅速地转变为 AMP 和 GMP。AMP 与 IMP 的不同仅仅是氨基取代了 6 位上的酮基，AMP 是经由两步反应途径合成的（图 22-3，左边）。在第一步反应中，天冬氨酸的氨基与 IMP 相连，生成**腺苷酸琥珀酸**，这步反应所需要的能量来自 GTP 水解为 GDP 和 P_i。在第二步反应中，**腺苷酸琥珀酸裂解酶**从腺苷酸琥珀酸中除去延胡索酸生成 ATP，该酶也催化 IMP 途径中的反应 9（图 22-1）。

GMP 也是从 IMP 经两步反应合成的（图 22-3，右边）。在第一步反应中，IMP 经 NAD^+ 还原脱氢，生成**黄苷酸**（XMP；碱基为**黄嘌呤**的核糖核苷酸）。然后在 ATP 水解为 AMP 和 PP_i（接着水解成 $2P_i$）的能量驱动下，通过转移谷氨酸胺的酰胺氮使 XMP 转变为 GMP。

核苷单磷酸磷酸化合成核苷二磷酸和核苷三磷酸

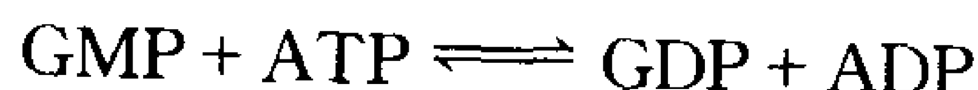
为了参与核酸的合成，核苷单磷酸必须先转变成相应的核苷三磷酸。首先，通过对碱基专一的**核苷单磷酸激酶**，从相应的核苷单磷酸合成核苷二磷酸。例如，腺苷酸激酶（节 13-2C）催化 AMP 磷酸化成为 ADP：

699



$$AMP + ATP \rightleftharpoons 2ADP$$

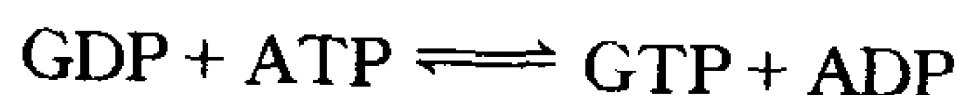
与此类似，GDP 通过对鸟嘌呤专一的酶生成：



$$GMP + ATP \rightleftharpoons GDP + ADP$$

这些核苷单磷酸激酶并不能区分底物中的核糖和脱氧核糖。

核苷二磷酸通过**核苷二磷酸激酶**转变成相应的核苷三磷酸，如：



$$GDP + ATP \rightleftharpoons GTP + ADP$$

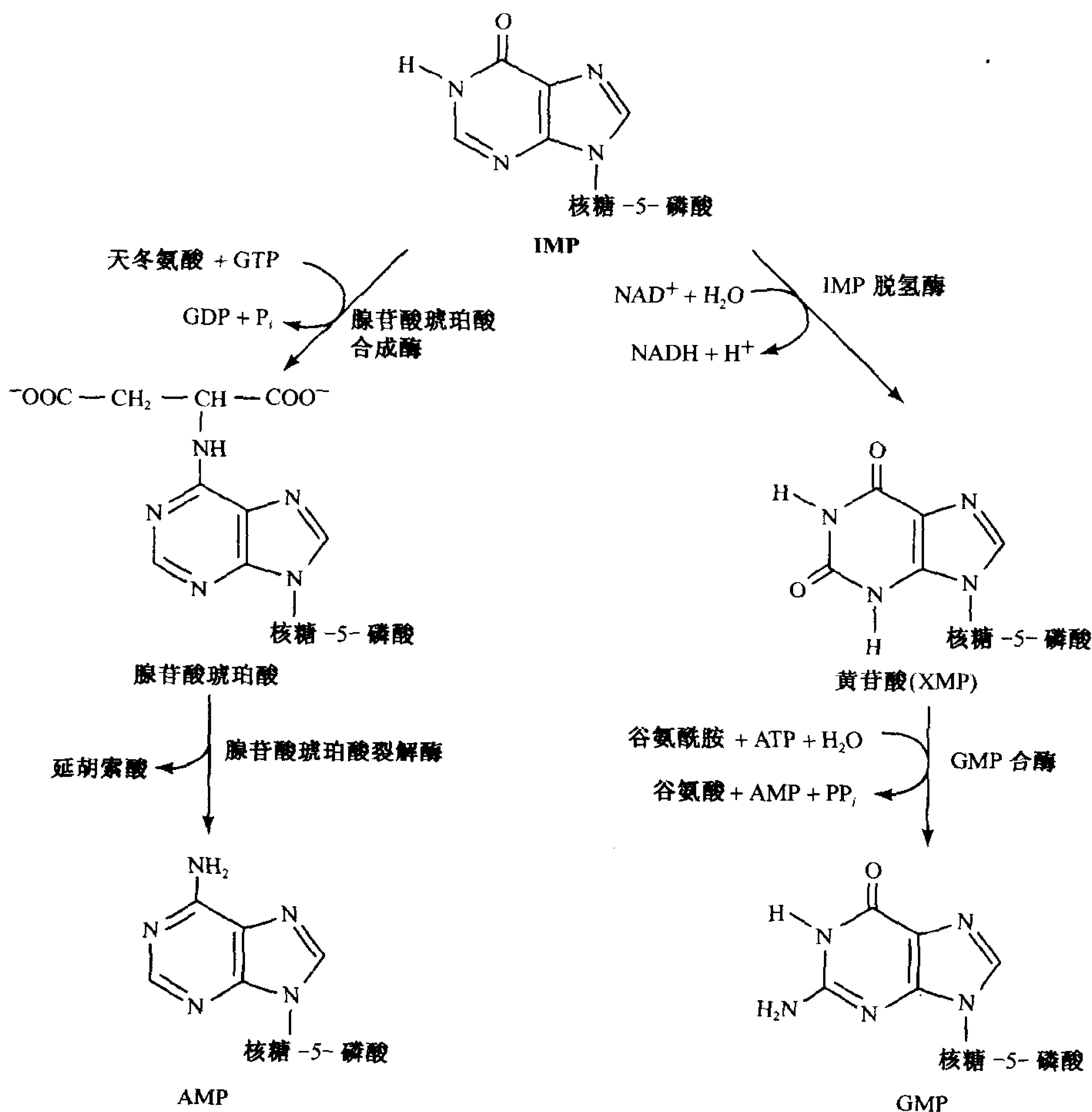


图 22-3 IMP 以不同的两步反应途径转变为 AMP 或 GMP

虽然该反应被写成以 ATP 作为磷酸基的供体，但是该酶对它的底物的碱基、核糖或脱氧核糖并无选择性。而且从底物和产物几乎完全相同的结构可以预料，该反应的进行通常接近平衡($\Delta G \approx 0$)。当然，ADP 也可通过各种释放能量的反应，如糖酵解和氧化磷酸化这些反应而转变成 ATP。事实上，也是这些反应最终驱动前面所述的激酶的反应。

C. 嘌呤核苷酸生物合成的调节

在大多数细胞中，合成 IMP、ATP 和 GTP 的途径是各自被调节的，如此控制可提供核酸合成的嘌呤核苷酸的总量以及 ATP 和 GTP 的相对量。这种控制的网络见图 22-4。

IMP 途径是在它最初的两个反应中被调节的，即催化 PRPP 和 5-磷酸核糖胺合成的反应。磷酸核糖焦磷酸激酶，即催化 IMP 途径中反应 1 的酶(图 22-1)，被 ADP 和 GDP 抑制。催化 IMP 途径中第一个限速步骤(反应 2)的磷酸核糖酰胺基转移酶，也是反馈抑制的对象。在这个实例中，该酶在一个抑制位点上结合 ATP、ADP 和 AMP，在另一个抑制位点上结合 GTP、GDP 和 GMP。所以，IMP 生成的速率是独立地，但也是协同地被腺嘌呤核苷酸和鸟嘌呤核苷酸的水平调控。此外，磷酸核糖酰胺基转移酶被 PRPP 别构激活(**前馈激活**)。

紧接着第二水平的调节发生在从 IMP 到 AMP 和 GMP 的分支点下面。AMP 和 GMP 是它们自身合成途径中 IMP 的竞争性抑制剂，从而防止产物的过多积累。另外，腺嘌呤和鸟嘌呤核苷酸的合成速率是相互协调的。如前所述，GTP 提供从 IMP 合成 AMP 的能量，而 ATP 提供从 IMP 合成 GMP 的能量(图 22-3)。这种交互作用平衡了 AMP 和 GMP 的生成量(在核酸生物合成中，大约需要等量的 AMP 和 GMP)。GMP 合成的速率随[ATP]的增加而增加，而 AMP 合成的速率随[GTP]的增加而增加。

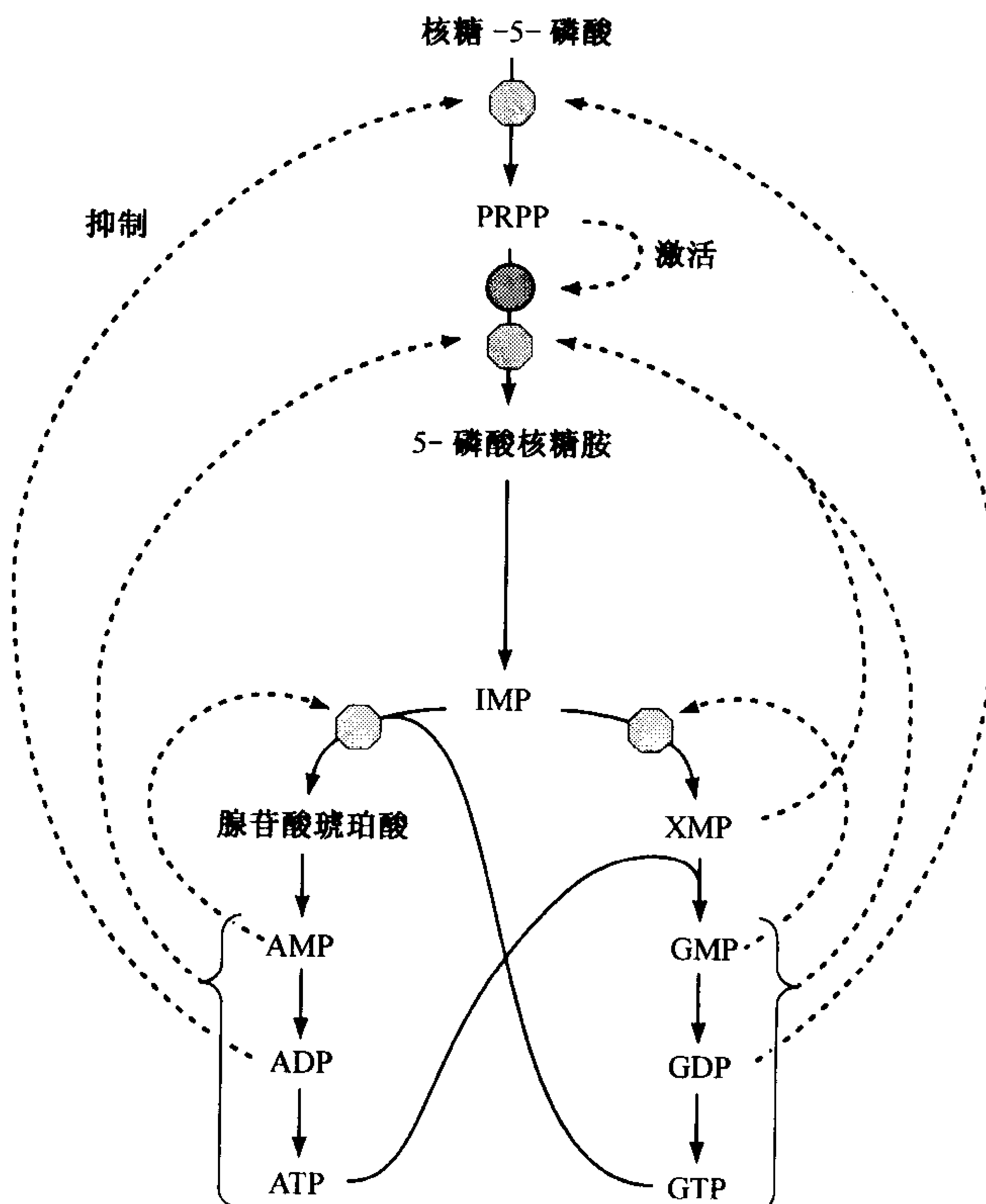


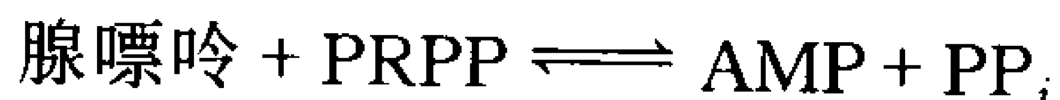
图 22-4　嘌呤生物合成途径的控制

红色的八边形和绿色的圆点代表控制点。红色虚线箭头表示反馈抑制，而绿色虚线箭头表示前馈激活。

700

D. 嘌呤的补救途径

在大多数细胞中，核酸的转化，特别是某些类型的 RNA，释放出腺嘌呤、鸟嘌呤和次黄嘌呤(节 22-4A)。这些游离的嘌呤通过**补救途径**(salvage pathway)重新转变成它们相应的核苷酸。与嘌呤核苷酸从头合成途径不同之处在于，从头合成途径事实上在所有细胞中是相同的，而补救途径的特征和分布则各不相同。在哺乳动物中，嘌呤大部分是通过两种不同酶进行补救。**腺嘌呤磷酸核糖转移酶**(APRT)催化由 PRPP 生成 AMP 的反应：

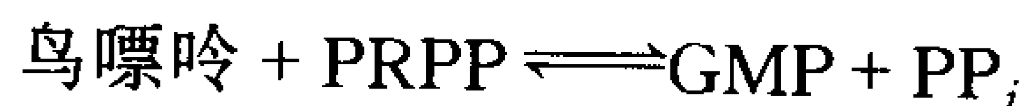


$$\text{腺嘌呤} + \text{PRPP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{PP}_i$$

次黄嘌呤—鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)催化次黄嘌呤和鸟嘌呤类似的反应：



$$\text{次黄嘌呤} + \text{PRPP} \rightleftharpoons \text{IMP} + \text{PP}_i$$



$$\text{鸟嘌呤} + \text{PRPP} \rightleftharpoons \text{GMP} + \text{PP}_i$$

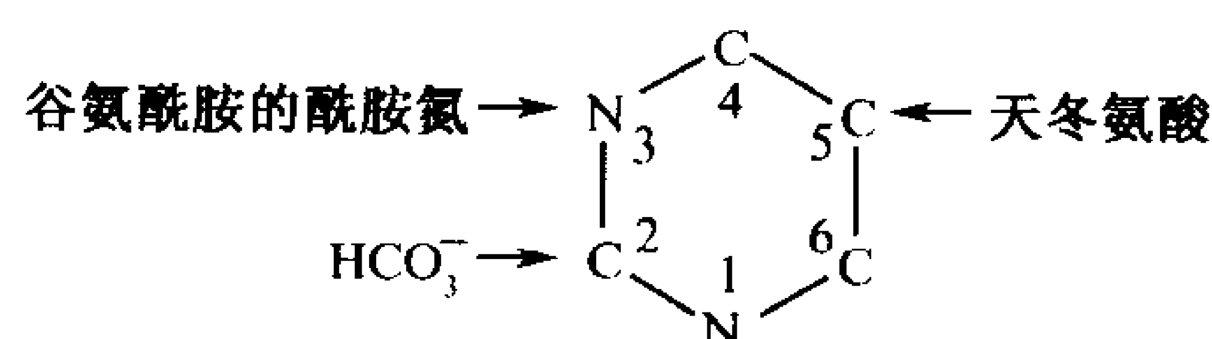
HGPRT 的缺乏导致自毁容貌综合征(Lesch-Nyhan Syndrome)

严重缺乏 HGPRT 产生**自毁容貌综合征**的症状，这说明嘌呤的补救反应不仅仅是为保存嘌呤从头生物合成所需的能量。这种性连锁的先天性缺陷(它多半影响男性)导致生成过多的尿酸(尿酸是嘌呤的降解产物，节 22-4A)和神经异常，例如痉挛、智力迟钝，以及高度侵略性和毁坏性行为，包括自残这种古怪的强迫性行为。例如，许多有自毁容貌综合征的孩子会有不可遏制的冲动，想咬自己的嘴唇和手指，他们必须被制止。

不难解释为什么患自毁容貌综合征的病人体内尿酸过多。HGPRT 活性的缺乏导致 PRPP 的累积，而 PRPP 通常用来补救次黄嘌呤和鸟嘌呤。过多的 PRPP 激活了磷酸核糖酰胺基转移酶（它催化 IMP 生物合成途径中的反应 2），因此大大加速了嘌呤核苷酸的合成，从而生成它们的降解产物——尿酸，然而与神经异常相关的生理基础尚不清楚。单个酶的缺陷可导致如此深远、定义明确的行为改变，无疑具有重要的精神病学意义。

2. 嘧啶核糖核苷酸的合成

嘧啶的生物合成比嘌呤简单。同位素标记实验表明，嘧啶环上的 N1、C4、C5 和 C6 原子都来自天冬氨酸，C2 来自 HCO_3^-，N3 来自谷氨酰胺。



701 A. UMP 的合成

UMP 是 CMP 的前体，它是通过 6 步反应途径而合成的（图 22-5）。与嘌呤核苷酸的合成不同，嘧啶环是在环被合成后才与核糖-5-磷酸偶联。

1）氨甲酰磷酸的合成

嘧啶生物合成的第一步是通过胞液中的**氨甲酰磷酸合成酶 II**，由 HCO_3^- 和谷氨酰胺的酰胺氮合成**氨甲酰磷酸**。该反应消耗两分子 ATP：一个提供磷酸基，另一个提供反应所需的能量。氨甲酰磷酸也可通过尿素循环合成（节 20-3A）。那个反应由线粒体中的氨甲酰磷酸合成酶 I 催化，氨是氮的来源。

2）氨甲酰天冬氨酸的合成

702 在**天冬氨酸转氨甲酰酶**（ATCase）的催化下，由氨甲酰磷酸和天冬氨酸缩合生成**氨甲酰天冬氨酸**。这个反应不需要 ATP 的水解就能进行，因为氨甲酰磷酸已被激活。大肠杆菌中 ATCase 的结构和调节已在节 12-3 中讨论。

3）闭环生成二氢乳清酸

此途径的第三步反应是在**二氢乳清酸酶**的催化下，经分子内缩合生成**二氢乳清酸**。

4）二氢乳清酸的氧化

二氢乳清酸在**二氢乳清酸脱氢酶**的作用下，不可逆地氧化为**乳清酸**。真核生物的二氢乳清酸脱氢酶含有 FMN 和非血红素铁，位于线粒体内膜的外表面，由醌提供其氧化所需的能量。嘧啶核苷酸生物合成的其他 5 种酶都在动物细胞的胞液中。

5）核糖磷酸组分的获得

在**乳清酸磷酸核糖转移酶**的催化下，乳清酸与 PRPP 反应生成**乳清酸核苷-5′-磷酸**。由除去的 PP_i 水解驱动的这个反应，决定了嘧啶核苷酸为 β 构型的异头形式。乳清酸磷酸核糖转移酶也补救其他的嘧啶碱基，如尿嘧啶和胞嘧啶，将它们转变成相应的核苷酸。

6）脱羧生成 UMP

此途径的最后一步反应是在 **OMP 脱羧酶**催化下，OMP 脱羧生成 UMP。这是一个不需

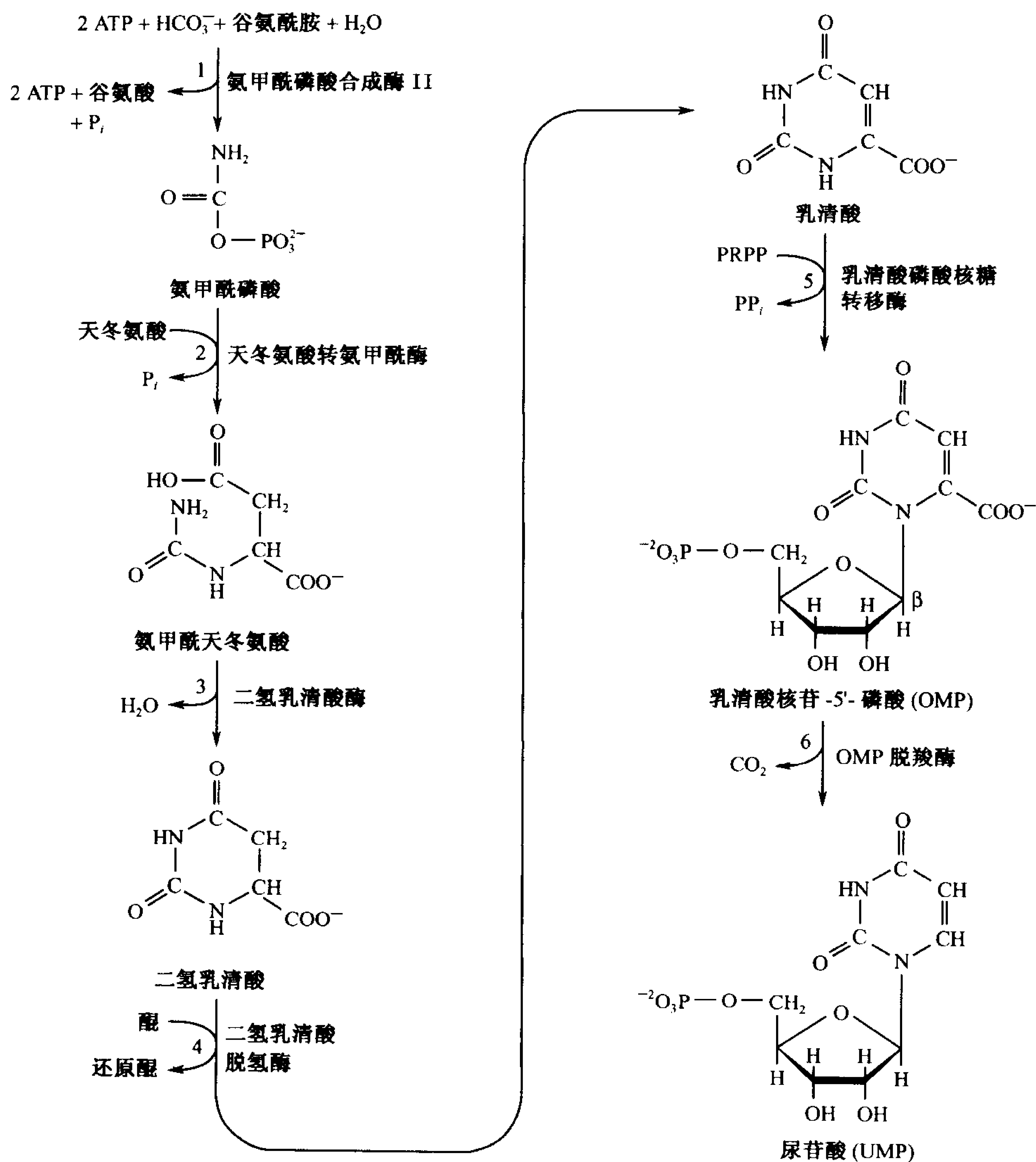


图 22-5 *代谢的秘诀*:UMP的从头合成途径
该代谢途径包括6步酶催化反应。

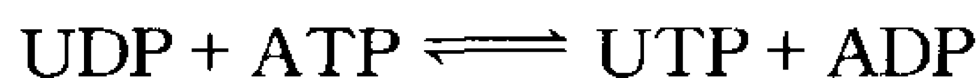
要辅因子的不寻常的反应。

在细菌中,UMP生物合成所需的6种酶以独立的蛋白质形式存在。但在动物中,正如 Mary Ellen Jones 所指出的,该途径中的前三种酶,即氨甲酰磷酸合成酶 II、ATCase 和二氢乳清酸酶的活性发生在一条210kDa的多肽链上。与此类似,动物嘧啶合成途径中的反应5和6也是由单链多肽催化的。在动物的嘌呤生物合成途径中(节22-1A),单链多肽催化反应3、4和6,反应7和8,以及反应10和11。*这些多功能酶的中间产物并不很快释放到介质中,而是被引入到该途径的后续酶的活性中心*。与丙酮酸脱氢酶复合物(节16-2)、脂肪酸合成酶(节19-4C)和色氨酸合成酶(节20-5B)一样,在核苷酸合成途径中中间产物的引导增加了这些多步骤过程的总速率,并保护中间产物免受其他细胞内酶的降解。

B. UTP 和 CTP 的合成

从 UMP 合成 UTP 与嘌呤核苷三磷酸的合成相类似(节 22-1B)。该过程是核苷单磷酸激酶和核苷三磷酸激酶顺序催化的反应：





CTP 的生成是通过 UTP 的氨基化，由 **CTP 合成酶**催化(图 22-6)。在动物中氨基由谷氨酰胺提供，而在细菌中氨基直接由氨提供。

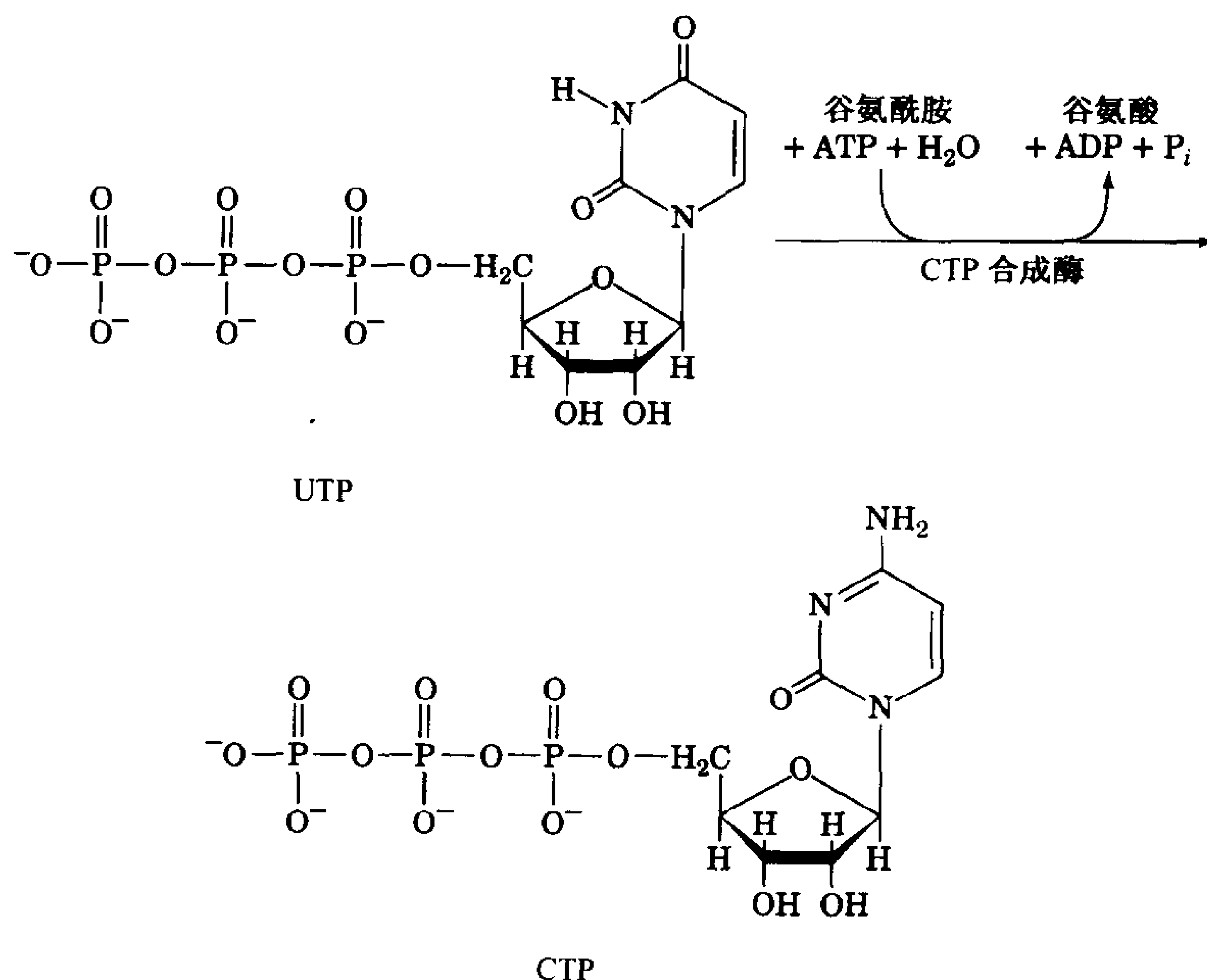


图 22-6 由 UTP 合成 CTP

703

C. 嘧啶核苷酸生物合成的调节

在细菌中，嘧啶生物合成途径主要在反应 2，即 ATCase 催化的这步反应被调节(图 22-7a)。在大肠杆菌中，通过 ATP 对 ATCase 的别构激活、CTP 对 ATCase 的别构抑制而进行控制(节 12-3)。然而在许多细菌中，UTP 是 ATCase 的主要抑制剂。

在动物中 ATCase 并不是一个调节酶。嘧啶生物合成的调节是通过控制氨甲酰磷酸合成酶 II 的活性，该酶被 UDP 和 UTP 抑制，被 ATP 和 PRPP 激活(图 22-7b)。哺乳动物中，第二水平的调控是在 OMP 脱羧酶，UMP 和较低程度上 CMP 都是它的竞争性抑制剂，在所有生物中，OMP 产生的速率随它的前体 PRPP 的含量而变化。前面已提到 PRPP 的水平取决于核糖磷酸焦磷酸激酶的活性(图 22-1，反应 1)，该酶被 ADP 和 GDP 抑制(节 22-1C)。

704

遗传性酶缺乏导致乳清酸尿

乳清酸尿(orotic aciduria)是一种遗传性人类疾病，其特征是尿中排出大量乳清酸，生长停滞

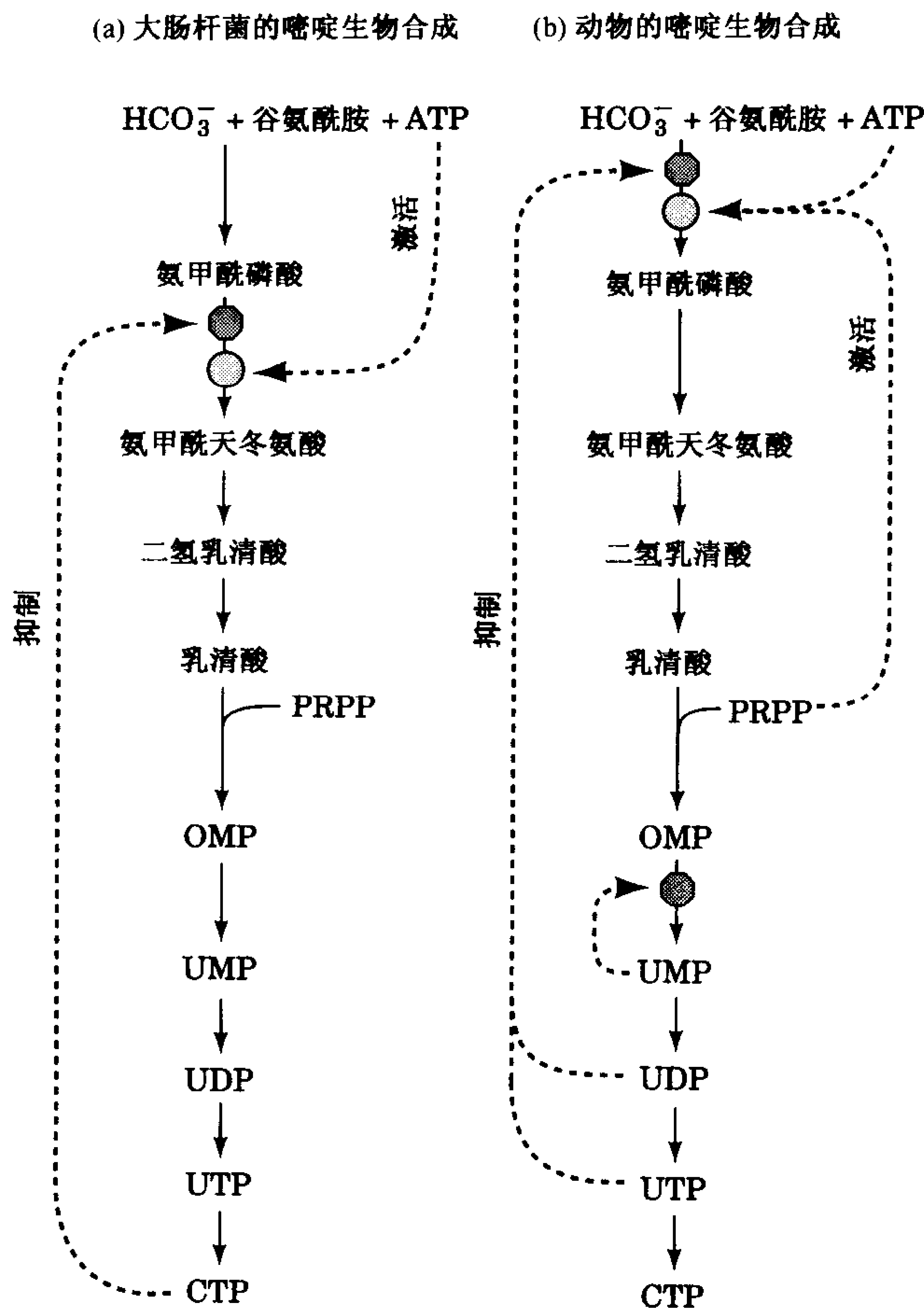


图 22-7　嘧啶生物合成的调节

(a)大肠杆菌。(b)动物的调控网络。红的八边形和绿的圆点表示控制点。
虚线红箭头表示反馈抑制,虚线绿箭头表示激活。

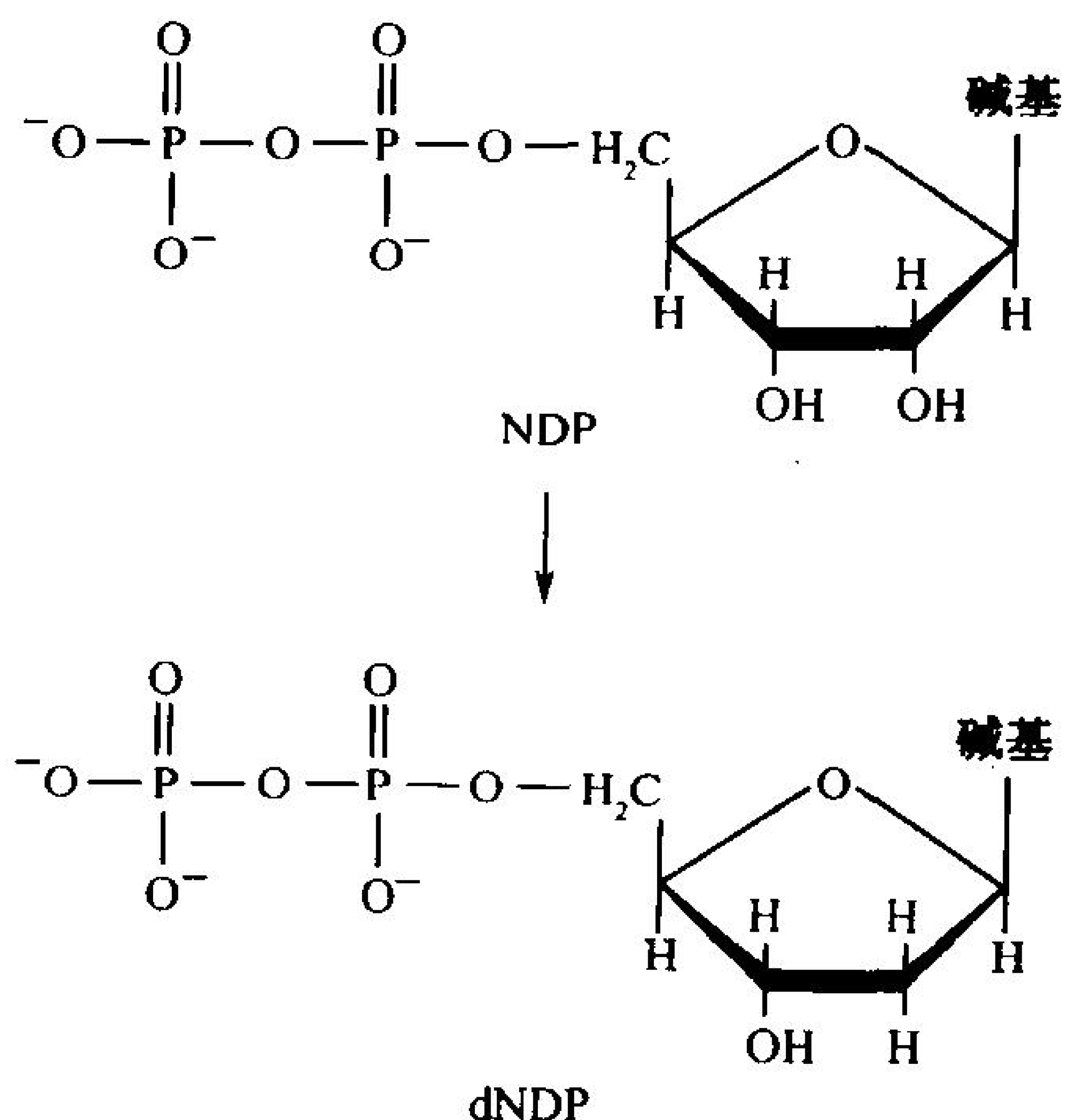
和严重的贫血症。催化嘧啶核苷酸生物合成途径中反应 5 和 6 的双功能酶的缺乏导致这种疾病。针对这种情况的生化机制,找到了有效的治疗方法:服用尿苷和(或)胞苷。UMP 是通过这些核苷的磷酸化生成的,除了替代正常的合成途径之外,还抑制了氨甲酰磷酸合成酶 II,从而减慢了乳清酸合成的速率。目前尚不知道人类嘧啶核苷酸生物合成途径中有其他遗传缺陷,可能因为这样的缺陷在子宫内是致死性的。

3. 脱氧核糖核苷酸的生成

DNA 与 RNA 在化学上的不同主要在以下两个方面:①它的核苷酸含有 2-脱氧核糖残基而不是核糖残基;②它含有胸腺嘧啶(5-甲基尿嘧啶)而不是尿嘧啶。在本节中我们将讨论 DNA 的这些组分的生物合成。

A. 脱氧核糖残基的合成

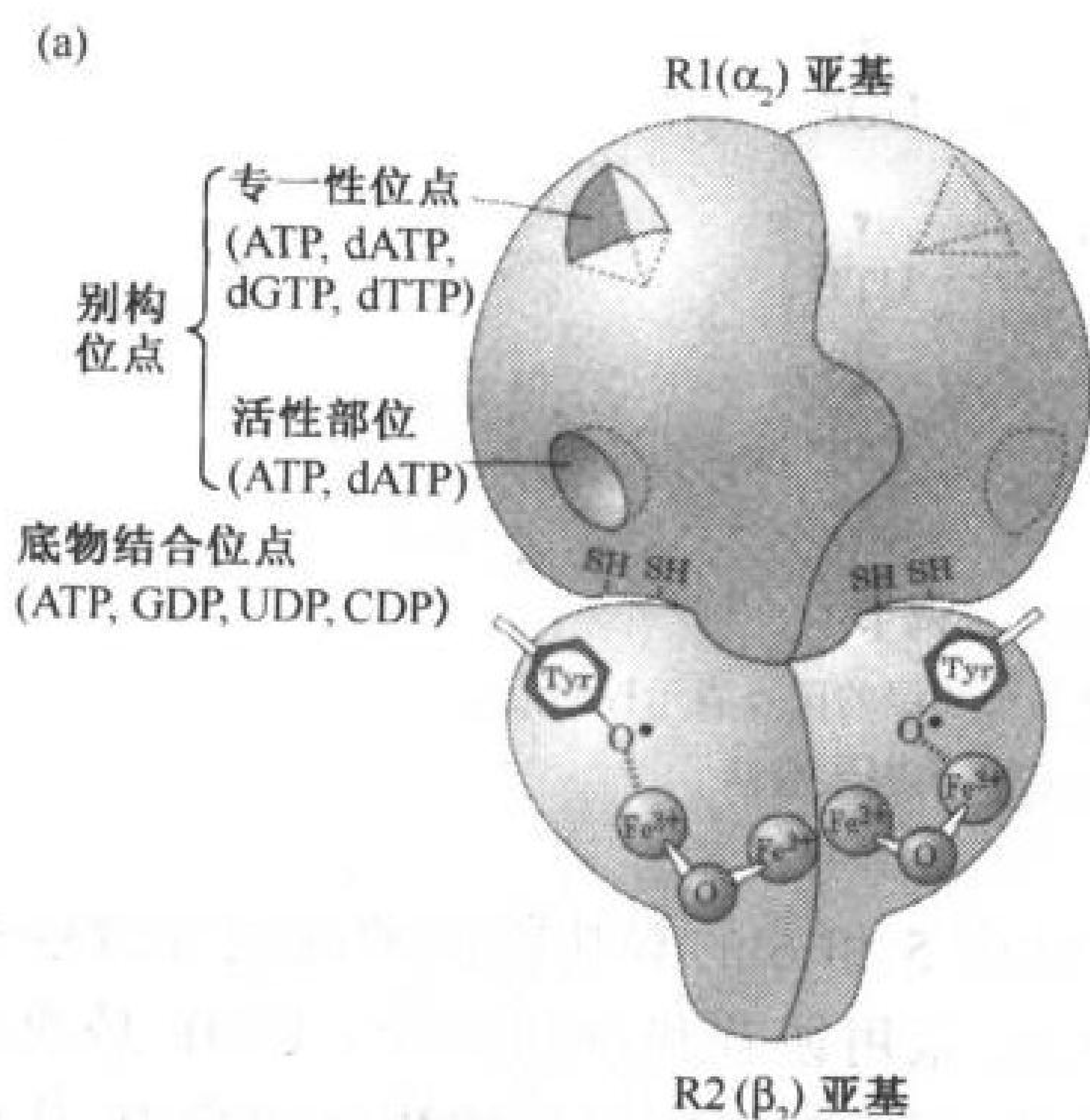
脱氧核糖核苷酸是从它们相应的核糖核苷酸通过 C2′位置的还原而得到，并非从含有脱氧核糖的前体从头合成而来。

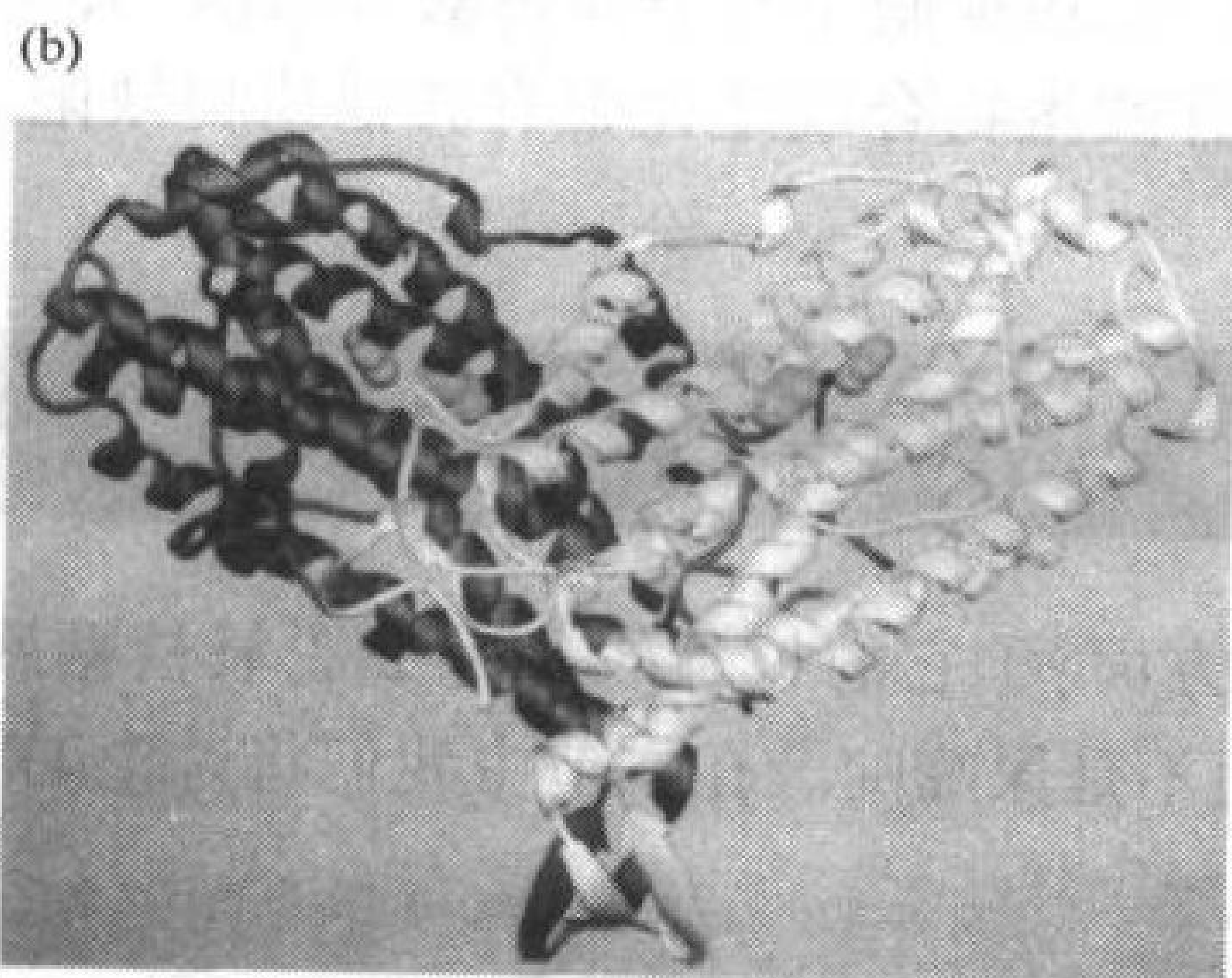


催化相应的核糖核苷酸还原成脱氧核糖核苷酸的酶称**核糖核苷酸还原酶**。有四类核糖核苷酸还原酶，虽然它们都通过自由基机制用 H 取代核糖的 2′-OH，但它们的辅基不同。我们将讨论存在于大多数真核生物和部分原核生物中的含铁酶的作用机制。

705

含铁的核糖核苷酸还原酶将核糖核苷二磷酸(NDP)还原成相应的脱氧核糖核苷二磷酸(dNDP)。正如 Peter Reichard 证实，大肠杆菌的核糖核苷酸还原酶是一个 $\alpha_2\beta_2$ 的四聚体，它可以解离成两个无催化活性的同源二聚体 R1(α_2)和 R2(β_2)(图 22-8a)。每个 α 亚基含有一个底物结合位点，该位点包含几个有氧化还原活性的巯基。α 亚基还含有两个独立的效应物结合位点，该位点控制酶的催化活性及它的底物专一性。





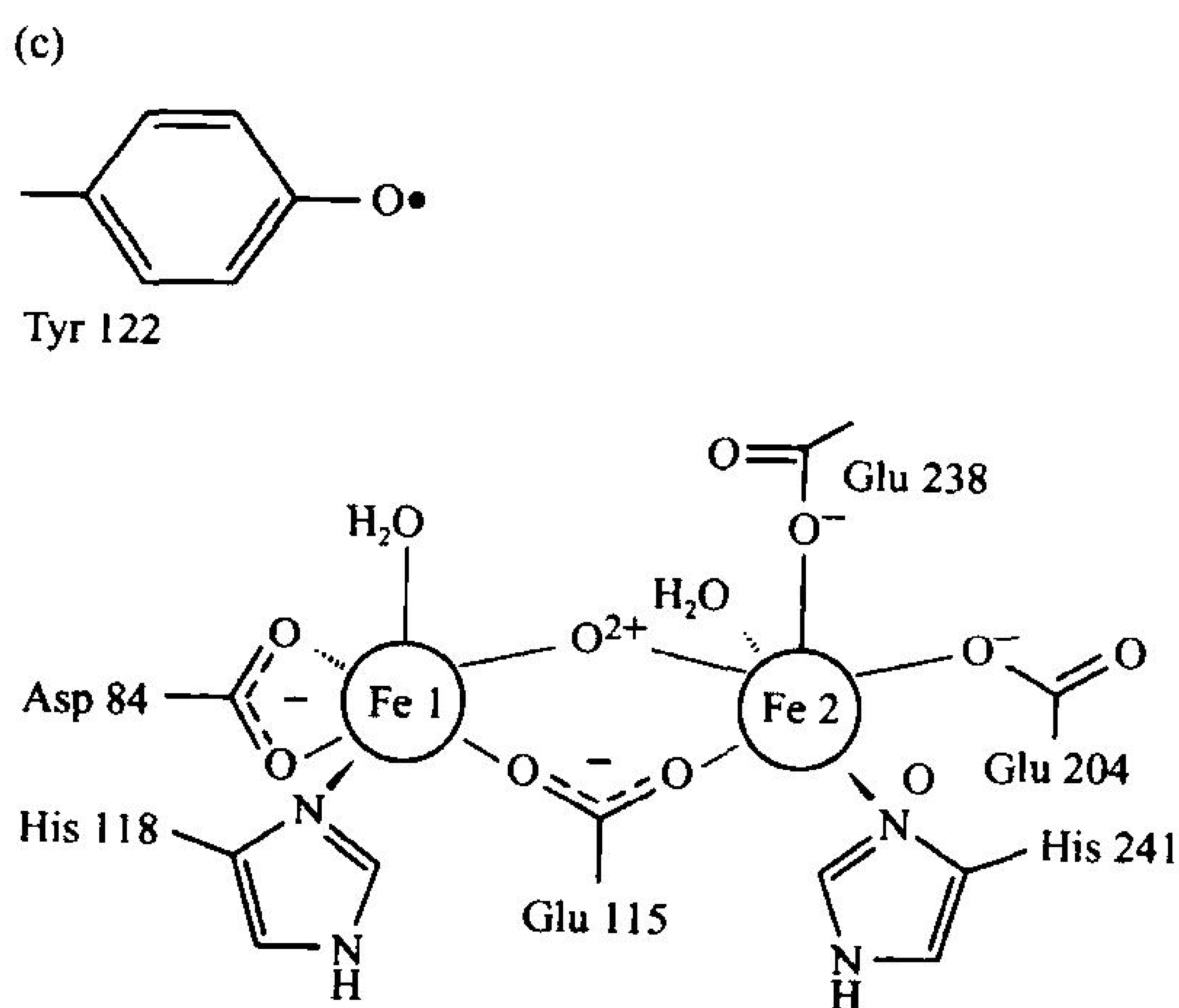


图 22-8 大肠杆菌核糖核苷酸还原酶

(a)四级结构的示意图。该酶由两对相同的亚基 R1(α_2)和 R2(β_2)组成。每个 β 亚基含有一个双核 Fe(III)复合物，它和第 122 位的酪氨酸形成一个苄氧自由基。每个 α 亚基含有 2 个不同的别构效应物位点和 5 个催化上重要的半胱氨酸残基。酶的两个活性中心在 α 和 β 亚基之间的交接面上。(b)R2 二重轴垂直观的带状图，β 亚基以蓝色和黄色表示。Fe(III)离子用橙色球表示，自由基所在的第 122 位酪氨酸侧链用空间充满模型表示，其中的碳和氧原子分别为绿色和红色。(c)R2 的双核 Fe(III)复合物。每个 Fe(III)离子与一个组氨酸的氮原子，包括 O^{2-} 的 5 个氧原子和架于两个 Fe(III)离子之间的谷氨酸的羧基成八面体配位。(图 b 是以瑞典农业科学大学 Hans Eklund 的 X 射线结构为根据)。

由 Hans Eklund 测定的 R2 和 X 射线结构(图 22-8b)揭示,β 亚基是由 8 束很长的螺旋组成。每个 β 亚基含有一个独特的双核 Fe(III)辅基,其中 Fe(III)离子与多种基团包括 O^{2-} 相配位(图 22-8c)。Fe(III)复合物与第 122 位的酪氨酸相互作用,形成一种不寻常的酪氨酰自由基,它与最近的 Fe 原子相距 5Å,并埋在蛋白质表面下 10Å 处,在那里它不与溶剂和任何可氧化侧链相接触。

JoAnne Stubbe 提出了大肠杆菌核糖核苷酸还原酶的如下催化机制(图 22-9):　706

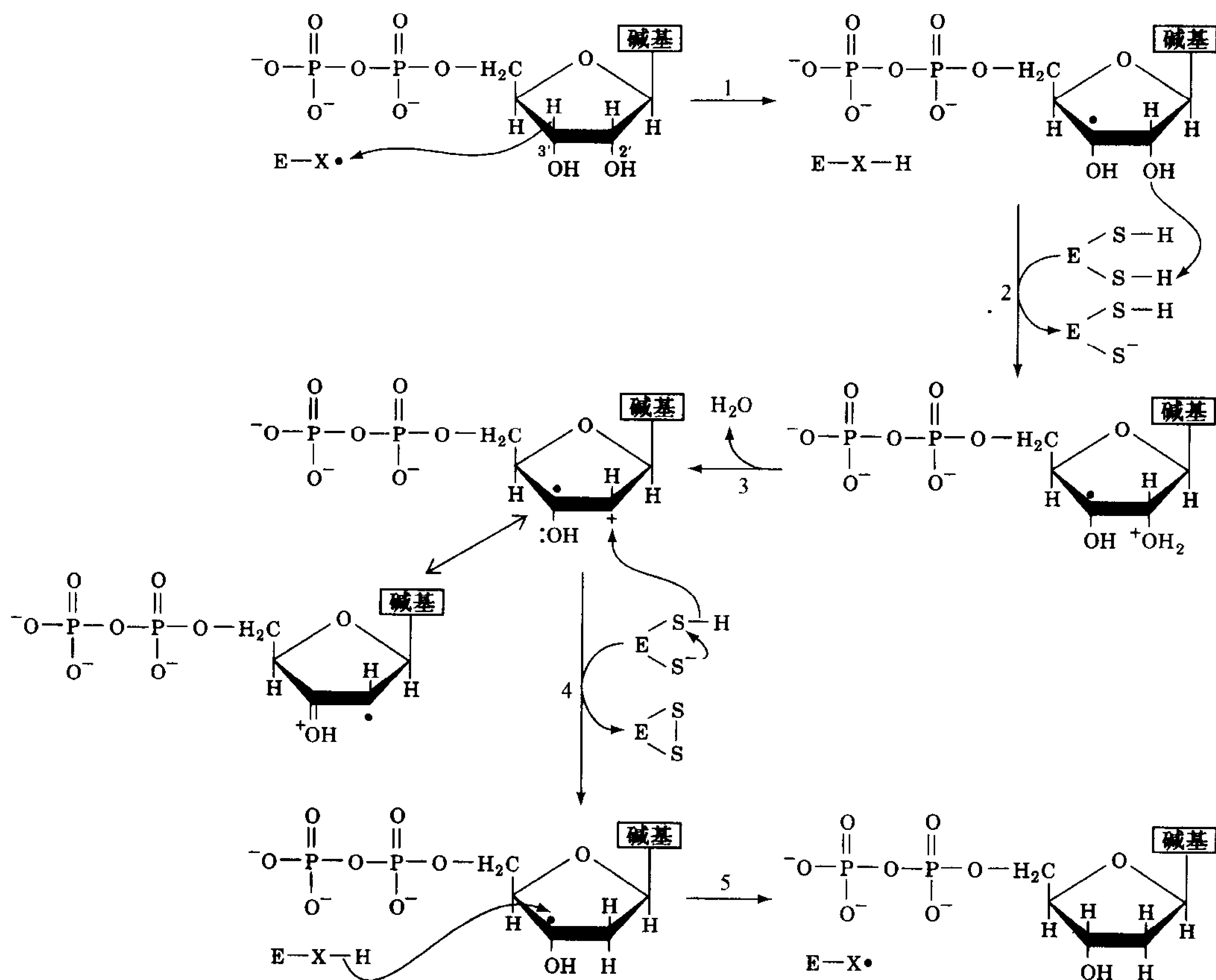


图 22-9　核糖核苷酸还原酶的酶促机制

反应是通过游离的自由基介导的过程进行的,酶二硫键的形成提供了此过程的还原当量。[引自 Stubbe, J.A., *J. Biol. Chen*. 265, 5330(1990)]

1) 在反应的限速步骤中,核糖核苷酸还原酶的自由基(X·)从底物的 C3′上夺取了一个氢原子。

2) 和 3) 酸催化 C2′—OH 键的断裂,释放出 H_2O,生成自由基正离子中间物,3′—OH 上未共享电子对稳定了 C2′正离子,这解释了自由基的催化作用。

4) 自由基正离子中间物被酶的氧化还原活性的巯基对还原,生成 3′-脱氧核苷酸自由基和蛋白质的二硫基团(该基团必须最终被氧化重新产生酶活性)。

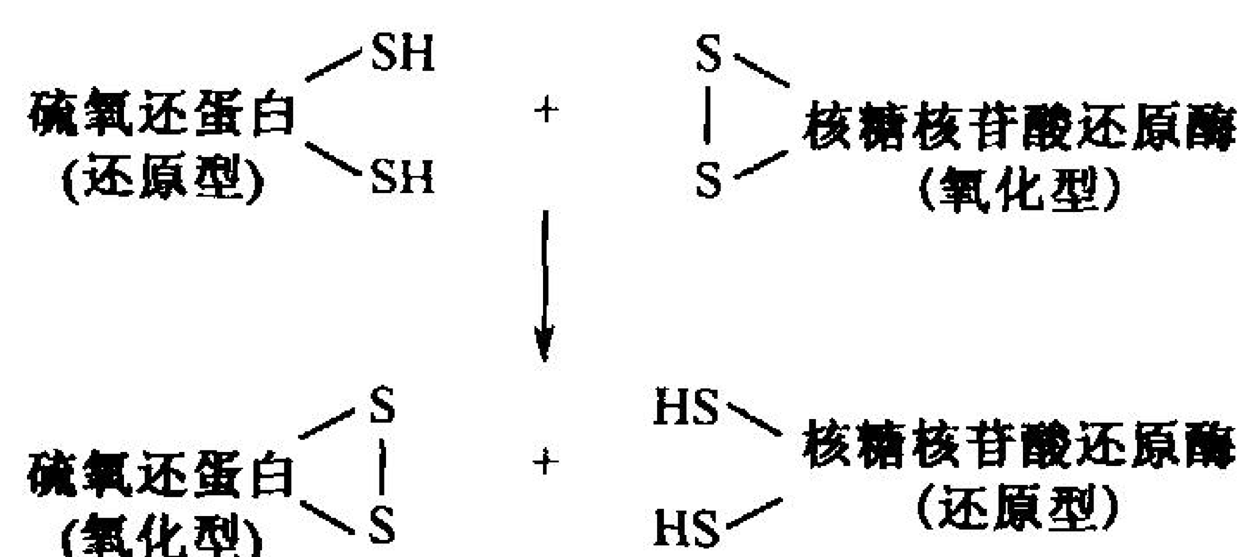
5) 3′自由基从蛋白质上抽取一个氢原子,生成产物脱氧核苷二磷酸,并使酶恢复到它的自

由基状态。

707

在 R2 中第 122 位酪氨酸自由基离酶的催化中心太远(>10Å),以致不能直接从底物上夺取电子。显然,R2 介导了电子,从这个酪氨酰自由基转移到另一个比较靠近底物的基团上,比较靠近底物的基团可能是 R1(图 22-9 中的 X·.)中第 439 位半胱氨酸的硫自由基(S·)。R1 的另外两个半胱氨酸残基可能形成了氧化还原活性的巯基对,这巯基对直接还原底物。生成的二硫键是通过与另外两个半胱氨酸残基的二硫键交换而被还原,这两个半胱氨酸残基定位于接收外来还原剂的电子,以重新生成有活性的酶。因此,R1 的每个亚基至少含有 5 个参与核苷酸还原的半胱氨酸残基。

硫氧还蛋白和谷氧还蛋白还原核糖核苷酸还原酶



在核糖核苷酸还原酶催化循环中的最后一步是还原该酶新生成的二硫键,从而重新形成它的氧化还原活性巯基对。该酶的生理还原剂之一是硫氧还蛋白,它是一个由 108 个残基组成、并普遍存在的单体蛋白质,具有一对相邻的半胱氨酸残基(它们也参与卡尔文循环的调节,节 18-3B)。硫氧还蛋白通过二硫键交换,还原氧化型的核糖核苷酸还原酶。硫氧还蛋白的 X 射线结构(图 22-10)揭示,它的氧化还原活性的二硫基团位于分子突出处,使得该蛋白质成为目前所知惟一的"雄性"酶的例子。



图 22-10 大肠杆菌氧化型(二硫)硫氧还蛋白的 X 射线结构

左边突出处的两个黄色的球代表蛋白质的氧化还原活性的二硫基团。[仿照 B. Furugren in Holmgren, A., Söderberg, B.-O., Eklund, H., and Branden, C.-I., Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 2307(1975)绘制]

氧化型的硫氧还蛋白，通过**硫氧还蛋白还原酶**所介导的反应再被还原，该还原酶含有氧化还原活性的巯基和一个 FAD 辅基。硫氧还蛋白还原酶是谷胱甘肽还原酶的同系物（框 14-3），并催化一个类似的反应：NADH 介导的二硫键底物的还原。因此，在核糖核苷酸还原酶催化的将 NDP 还原成 dNDP 的反应中，NADPH 作为末端还原剂（图 22-11）。 708

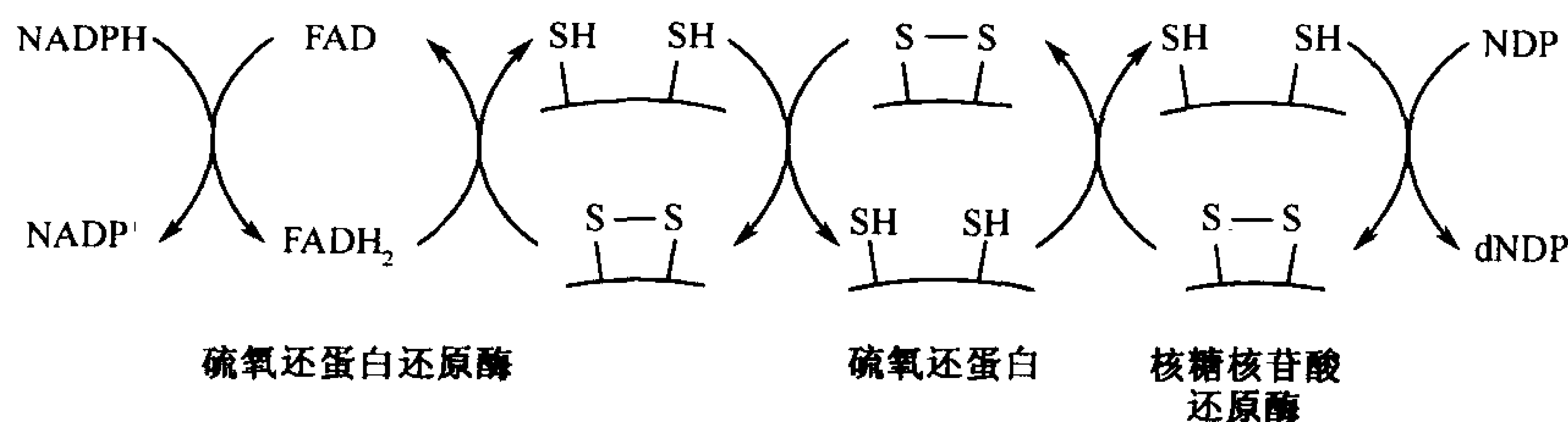


图 22-11　核苷二磷酸（NDP）还原的电子转移途径
NADH 通过硫氧还蛋白还原酶、硫氧还蛋白和核糖核苷酸还原酶作中介，为这个过程提供还原当量。

缺乏硫氧还蛋白的大肠杆菌突变株的存在，表明这个蛋白质不是体内惟一能够还原氧化型核糖核苷酸还原酶的物质。这一观察导致**谷氧还蛋白**的发现，它是一个含二硫键的由 85 个残基组成的蛋白质，这个蛋白质也能通过二硫键交换而还原核糖核苷酸还原酶（同时缺乏硫氧还蛋白和谷氧还蛋白的突变株不能存活）。硫氧还蛋白和谷氧还蛋白在核糖核苷二磷酸还原中的相对重要性还有待探讨。

核糖核苷酸还原酶被复杂的反馈网络调节

DNA 合成所需的 4 种 dNTP 的适量合成是通过反馈控制完成的。保持细胞内 dNTP 的适当比例是正常生长所必需的。实际上，任何一种 dNTP 的缺乏都是致死的。而过多则引起诱变，因为过多的 dNTP 错误地掺入到正在生长的 DNA 链的可能性，随着它相对于其他 dNTP 含量的增加而增加。

大肠杆菌和哺乳动物核糖核苷酸还原酶的活性与细胞中核苷酸的水平显著相关。大肠杆菌核糖核苷酸还原酶的 R1 亚基有两个独立的别构位点（图 22-8a）：

1）ATP 结合到**活性位点**，激活了酶对底物的靠近，这取决于效应物在**专一位点**上的结合；dATP 结合到活性位点则抑制酶与所有底物靠近；
2）在底物专一性位点，ATP 或 dATP 的结合促进 CDP 和 UDP 的还原；dTTP 的结合则促进 GDP 的还原，但抑制 CDP 和 UDP 的还原；dGTP 的结合则促进 ADP 还原，但抑制 CDP、UDP 和 GDP 的还原。

如果缺乏这些效应物中的任何一种，核糖核苷酸还原酶是没有活性的。

这些别构效应指明核糖核苷酸还原的顺序（图 22-12）。在存在 dNDP 混合物时，核糖核苷酸还原酶通过 ATP 促进的 CDP 和 UDP 的还原而开始产生 dNDP。生成的 dUDP 转 dTTP（如下节所述），dTTP 抑制了 CDP 和 UDP 的进一步还原，但促进 dGDP 的产生。dGDP 磷酸化为 dGTP 后，抑制了 CDP、UDP 和 GDP 的还原，但促进了 dADP 的产生，并因此产生 dATP。当 dATP 积累时，它结合到核糖核苷酸还原酶的活性位点，从而抑制了所有 NDP 的还原，除非 ATP 的水平高到足以置换 dATP。虽然这个图解无疑是对一个动态过程过分简化的描述，但它解释 709

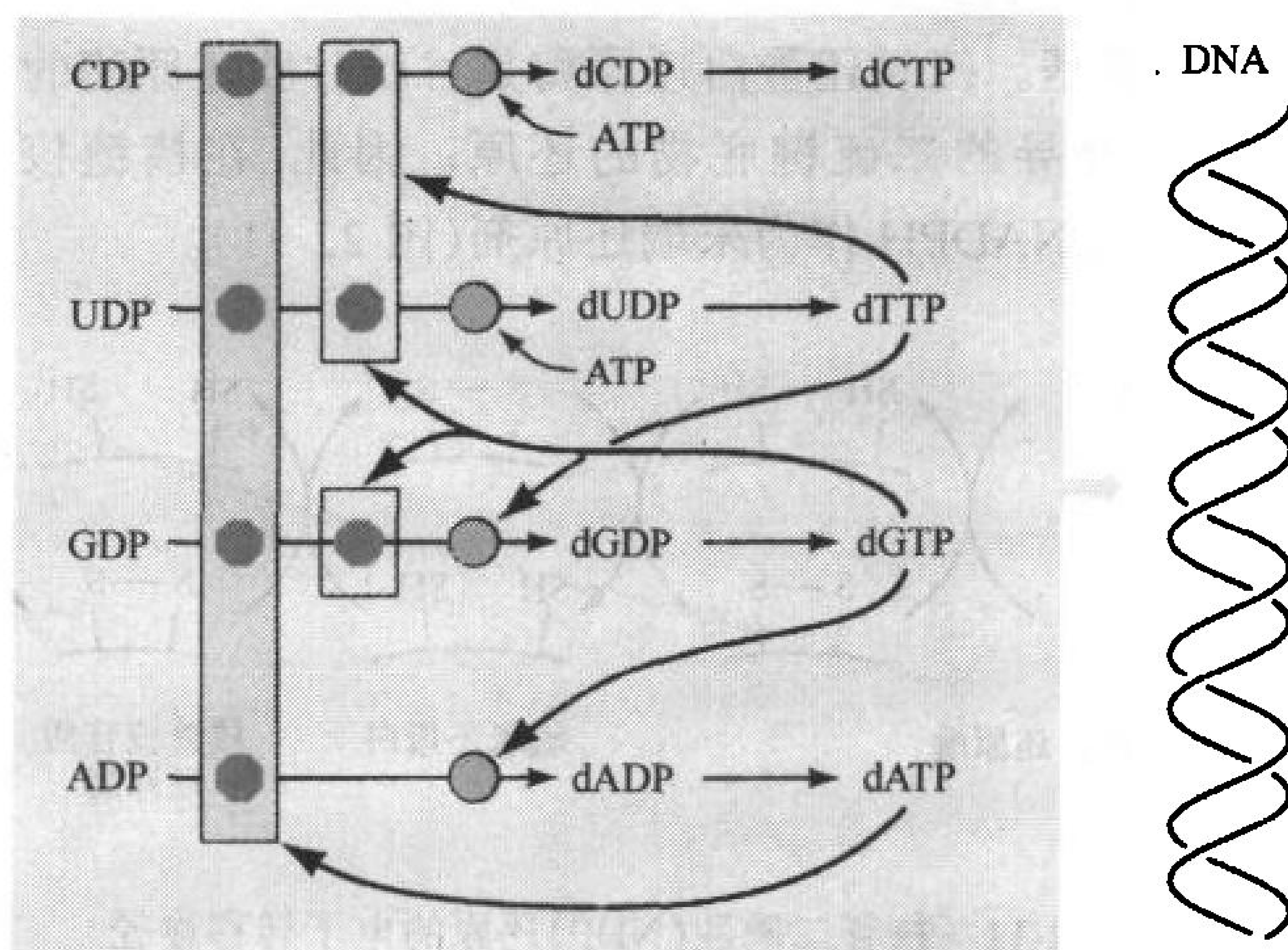
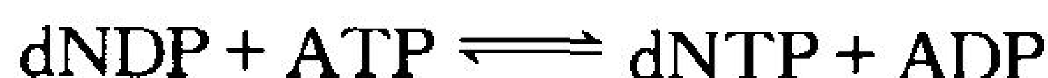


图 22-12 调控脱氧核糖核苷酸生物合成的网络
绿色的圆点和箭头代表激活；红色的八边形和箭头代表抑制。[引自 Thelender, L. and Reichard, P., Annu. Rev. Biochem. 48, 153(1978)]

了已观察到的细胞合成 DNA 所需的一定量的各种脱氧核糖核苷酸的能力。

dNTP 是通过 dNDP 磷酸化产生

产生所有 dNTP 的最后一步是相应的 dNDP 的磷酸化：

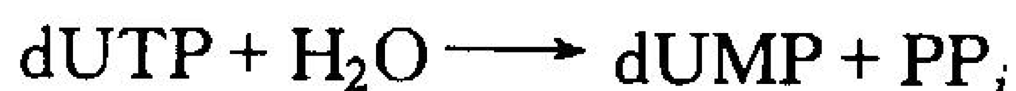


$$dNDP + ATP \rightleftharpoons dNTP + ADP$$

这个反应是由核苷二磷酸激酶催化，即与 NDP 磷酸化相同的酶（节 22-1B）。正如前所述，虽然任何一种 NTP 或 dNTP 都能作为磷酸基供体，但反应写成以 ATP 作为磷酸基的供体。

B. 胸腺嘧啶的来源

DNA 中的 dTMP 是通过 dUMP 甲基化而合成。dUMP 是由 dUTP 经 **dUTP 二磷酸水解酶**（dUTPase）水解而生成：



$$dUTP + H_2O \longrightarrow dUMP + PP_i$$

dTMP 一旦生成就被磷酸化，生成 dTTP。对于 dUTP 脱磷酸化和 dTMP 重新磷酸化，这一浪费能量过程的明显理由是细胞必须使 dUTP 的浓度最小，以防止尿嘧啶进入它们的 DNA（由 dNTP 合成 DNA 的酶系统并不能有效的区分 dUTP 和 dTTP）。

人的 dUTP 酶是一个由 141 个残基组成的亚基的同源三聚体。由 John Tainer 测定的 dUTP 酶的 X 射线结构揭示了该酶对于 dUTP 高度专一性的基础。每个亚基都在一个非常合适的空穴中结合 dUTP，这个空穴通过保守残基的侧链，在空间上把胸腺嘧啶的 C5 甲基排除在外（图 22-13a）。dUTP 酶区分尿嘧啶和类似形状的胞嘧啶是通过部分模拟腺嘌呤碱基对相互作用的一系列氢键（图 22-13b）。通过保守的酪氨酸的侧链，核糖的 2′-OH 基在空间上也同样地被排除在外。

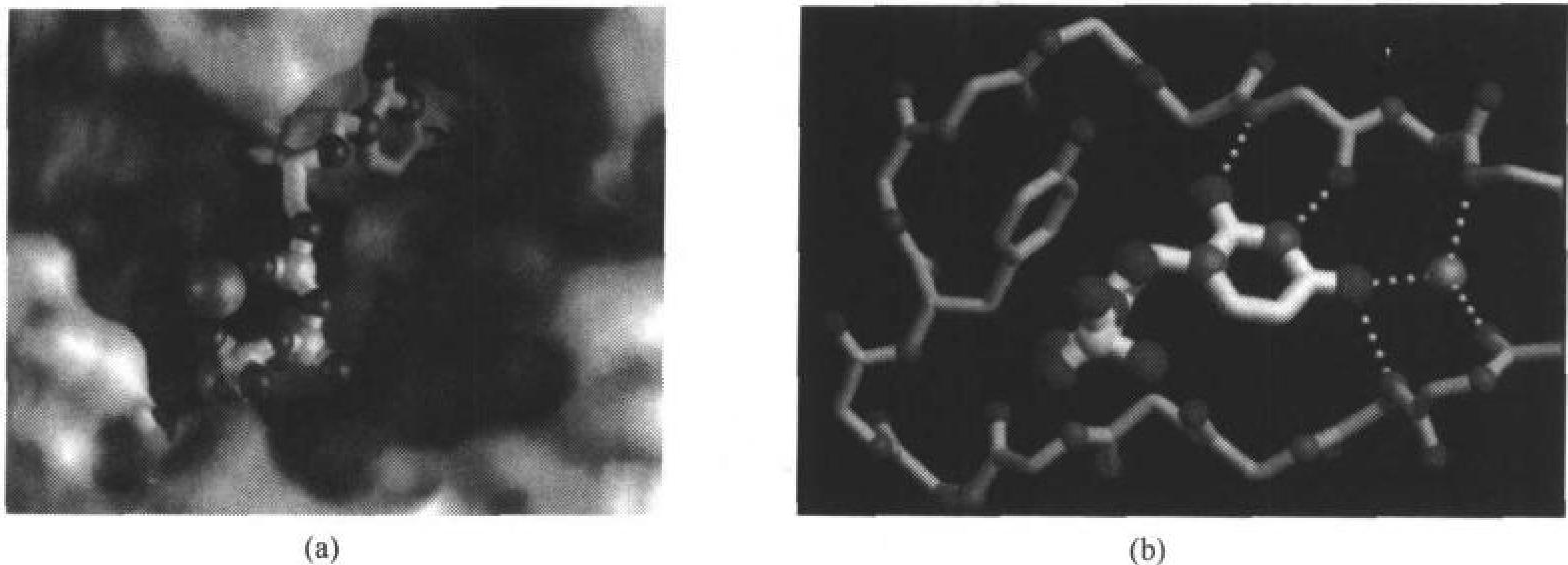


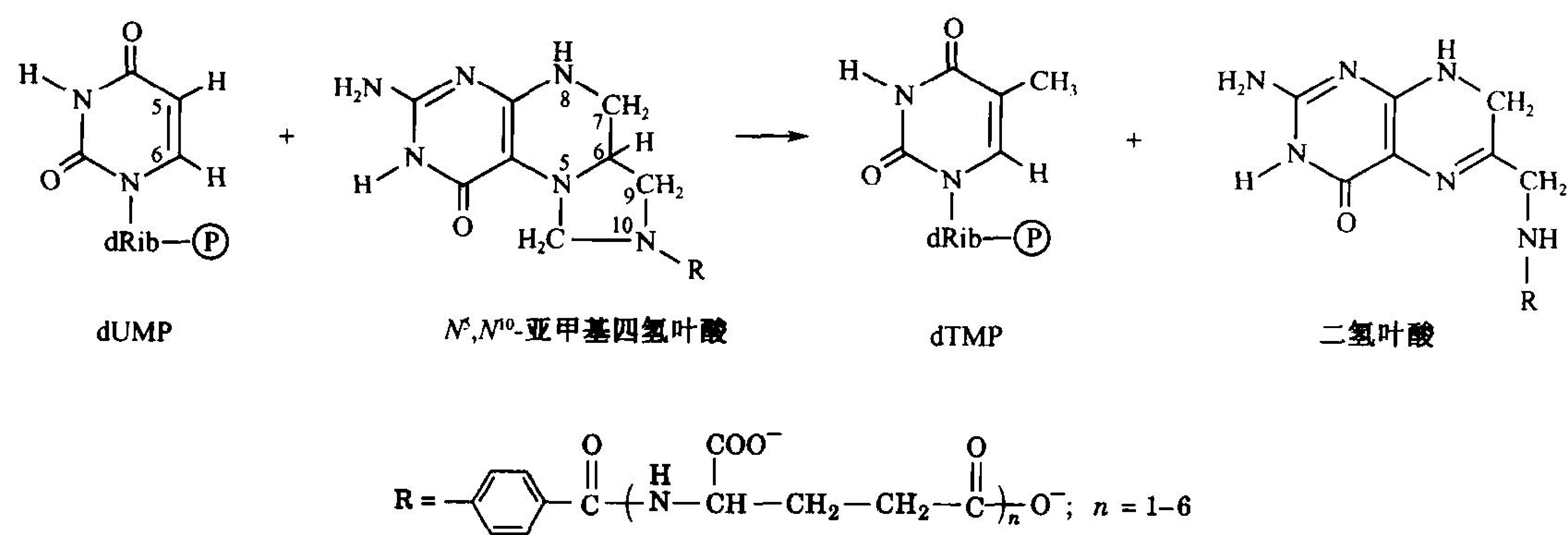
图 22-13　人 dUTP 酶的 X 射线结构

(a)dUTP 酶与 dUTP 的复合物中 dUTP 酶的活性中心。根据它的净电势，用该蛋白质分子表面的不同颜色来表示(负为红色，正为蓝色，接近中性的为白色)。dUTP 用球棍模型表示，它的氮、氧和磷原子分别为蓝色、红色和黄色。在结构中被模建的 Mg^{2+} 用绿色的球表示。注意尿嘧啶环与它的结合口袋完全互补，特别是可以区分嘧啶环的 C5 甲基以及核糖环的 2′-OH 基的紧密接触。(b)dUMP 的结合位点显示氢键系统负责该酶专一结合尿嘧啶环。DUMP 和结合它的多肽骨架用球棍模型表示，原子的颜色与图 a 一样；氢键用白的虚线表示；贮存的水分子用粉红色小球表示。保守的酪氨酸侧链被紧密包装以对抗核糖环，从而不利于 2′-OH 基的存在。(引自 John Tainer and Clifford Mol, The Scripps Research Institute, La Jolla, California)

胸苷酸合酶

710

胸苷酸是由**胸苷酸合酶**催化，以 N^5, N^{10}-亚甲基四氢叶酸(N^5, N^{10}-亚甲基 THF)作为甲基供体，从 dUMP 合成。



注意，以四氢叶酸辅因子氧化为**二氢叶酸**(DHF)为代价，转移的亚甲基(其中的碳为甲醛的氧化态)被还原为甲基(甲醇的氧化态)。

胸苷酸合酶是一个高度保守的 70kDa 的二聚体蛋白质，遵循 Daniel Santi 提出的催化机制(图 22-14)。

711

1) 酶的亲核基团即第 146 位的半胱氨酸的硫醇基进攻 dUMP 的 C6 形成共价加合物。

2) 形成烯醇式离子的 C5 攻击亚胺正离子的 CH_2 基团，形成酶-dUMP-THF 三元共价复合物。此亚胺正离子形式的 THF 和 N^5, N^{10}-亚甲基四氢叶酸处于平衡。

3) 酶的一个碱性基团夺取了与酶结合的 dUMP 的 C5 位置上的酸性质子，形成环外亚甲

基,并除去 THF 辅因子,夺来的质子随后与溶剂交换。

4) 氧化还原变化是通过 THF 的 C6 氢原子的迁移而实现的,它作为氢负离子结合到环外亚甲基上,使之转变成甲基并生成 DHF。此还原反应促使半胱氨酸的硫醇基从中间物上

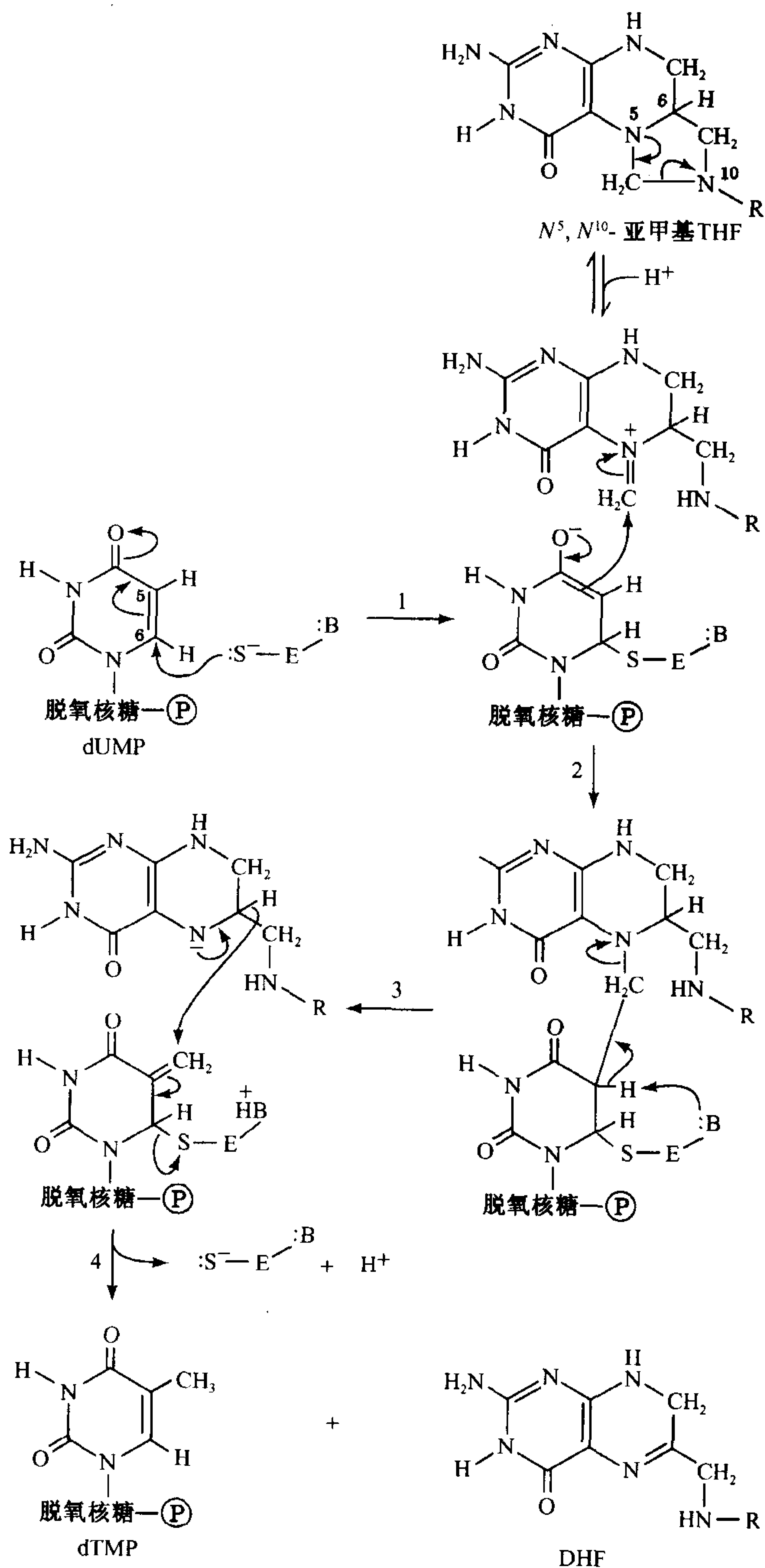


图 22-14 胸苷酸合酶的催化机制

甲基由 N^5,N^{10}-亚甲基 THF 提供,并伴随 N^5,N^{10}-亚甲基 THF 被氧化为二氢叶酸。

置换下来，并释放产物 dTMP 和重新生成有活性的酶。

通过二步反应重新生成四氢叶酸

712

胸苷酸合酶反应在生化上的独特之处在于它将 THF 氧化成 DHF；没有其他的酶反应以 THF 为辅因子，并改变辅酶的净氧化状态。胸苷酸合酶反应产生的 DHF 经过两步顺序反应，再循环回到 N^5, N^{10}-亚甲四氢叶酸(图 22-15)。

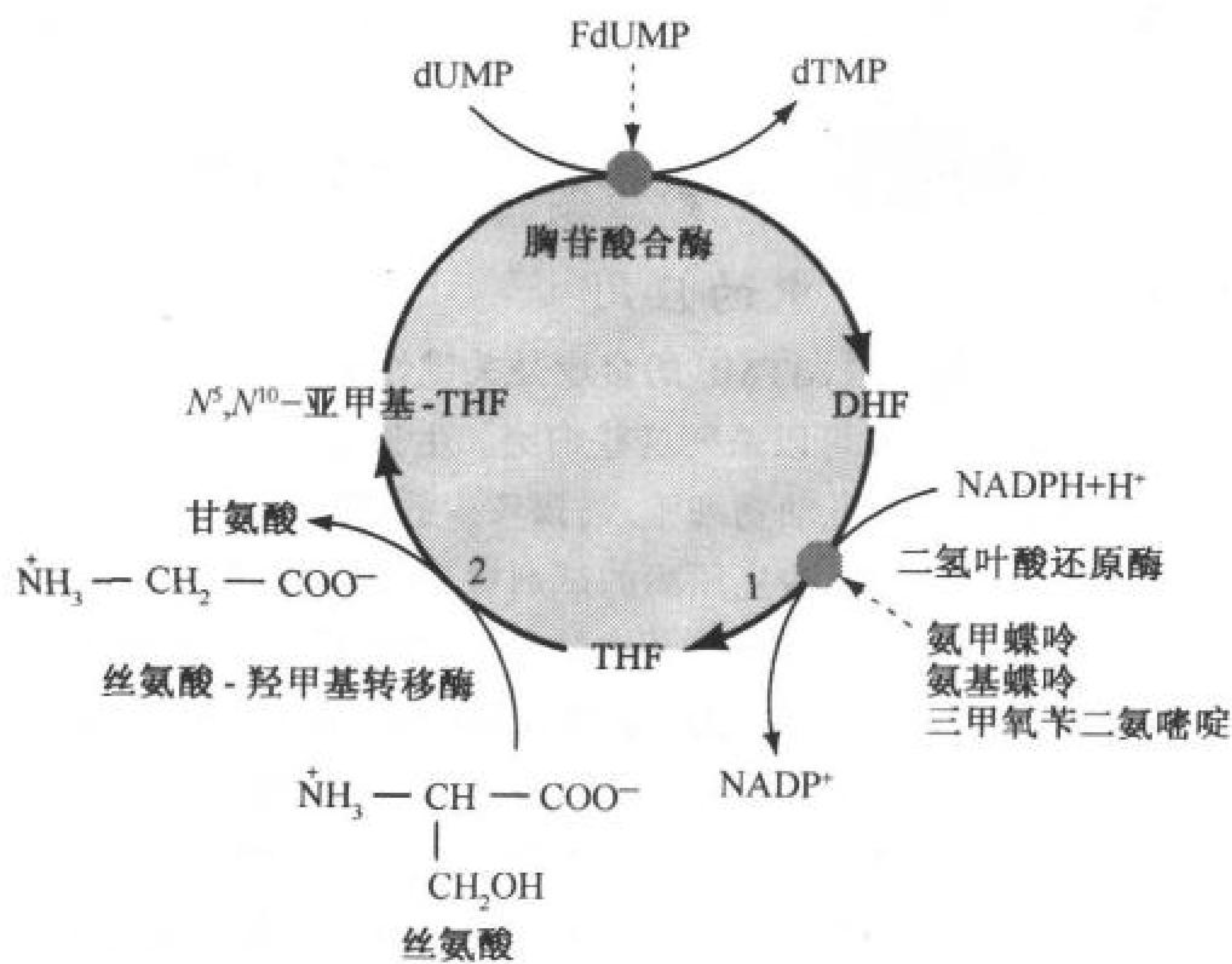


图 22-15　N^5, N^{10}-亚甲四氢叶酸的再生

胸苷酸合酶反应中生成的 DHF 通过顺序反应(1)二氢叶酸还原酶。(2)丝氨酸羟甲基转移酶，重新生成 N^5, N^{10}-亚甲四氢叶酸。一些抑制剂的作用位点用红色的八边形表示。胸苷酸合成酶被 FdUMP 抑制，而二氢叶酸还原酶被抗叶酸的氨甲蝶呤、氨基蝶呤和三甲氧苄二氨嘧啶抑制(见框 22-1)。

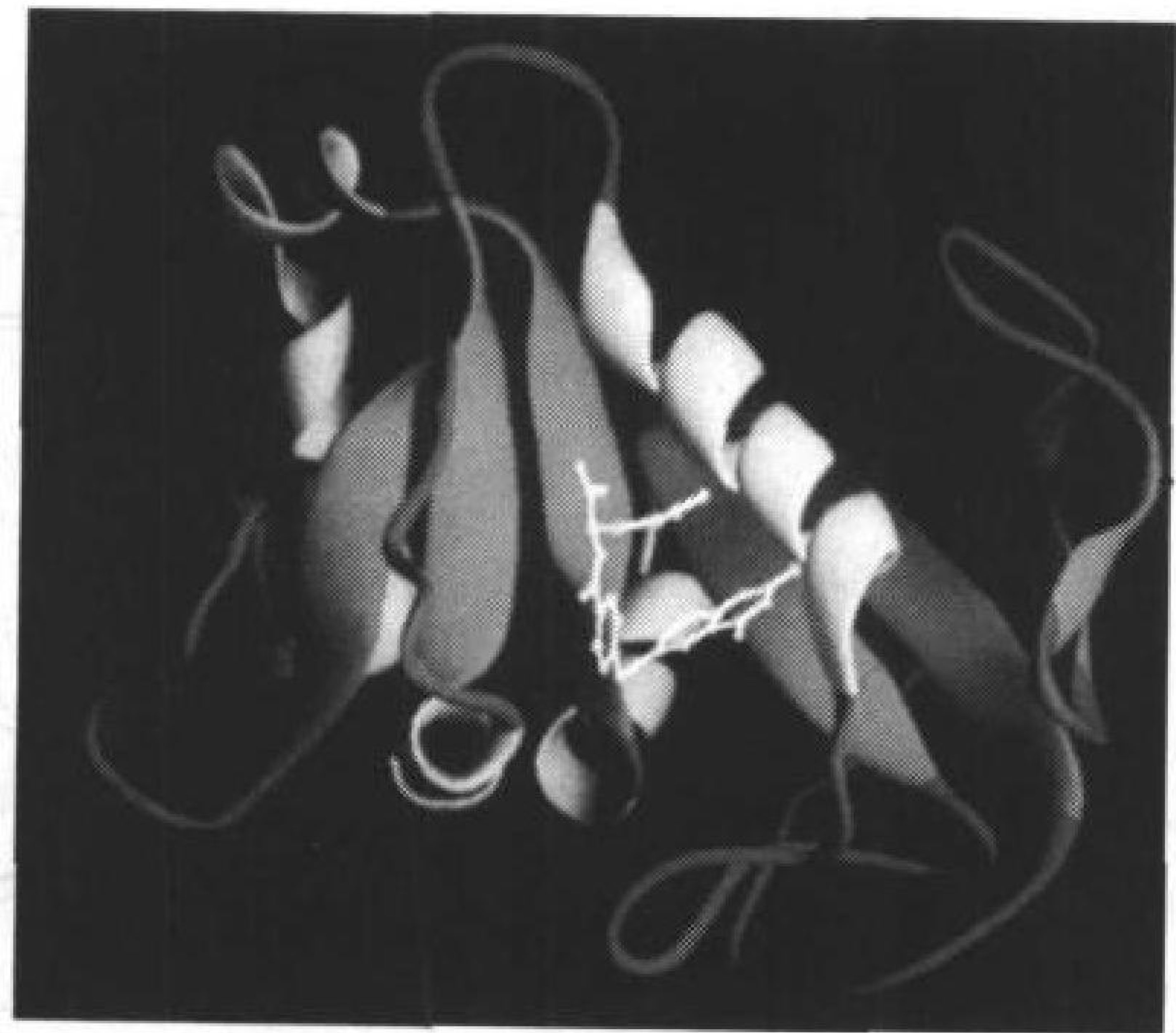


图 22-16　人二氢叶酸还原酶与叶酸复合物的带状图

单体酶的螺旋用黄色表示，β 折叠用橙色表示，而其他的多肽链肽段为蓝色。(引自 Jay E. Davies II and Joseph Kraut, University of California at San Diego)

1) **二氢叶酸还原酶**(DHFR)(图 22-16)催化 DHF 被 NADPH 还原为 THF。虽然在大多数生物中 DHFR 是单体、单功能酶,但在原生动物和一些植物中,DHFR 和胸苷酸合成酶是在同一多肽链上,形成双功能酶,该双功能酶将 DHF 从胸苷酸合酶引入到 DHFR 的活性中心。

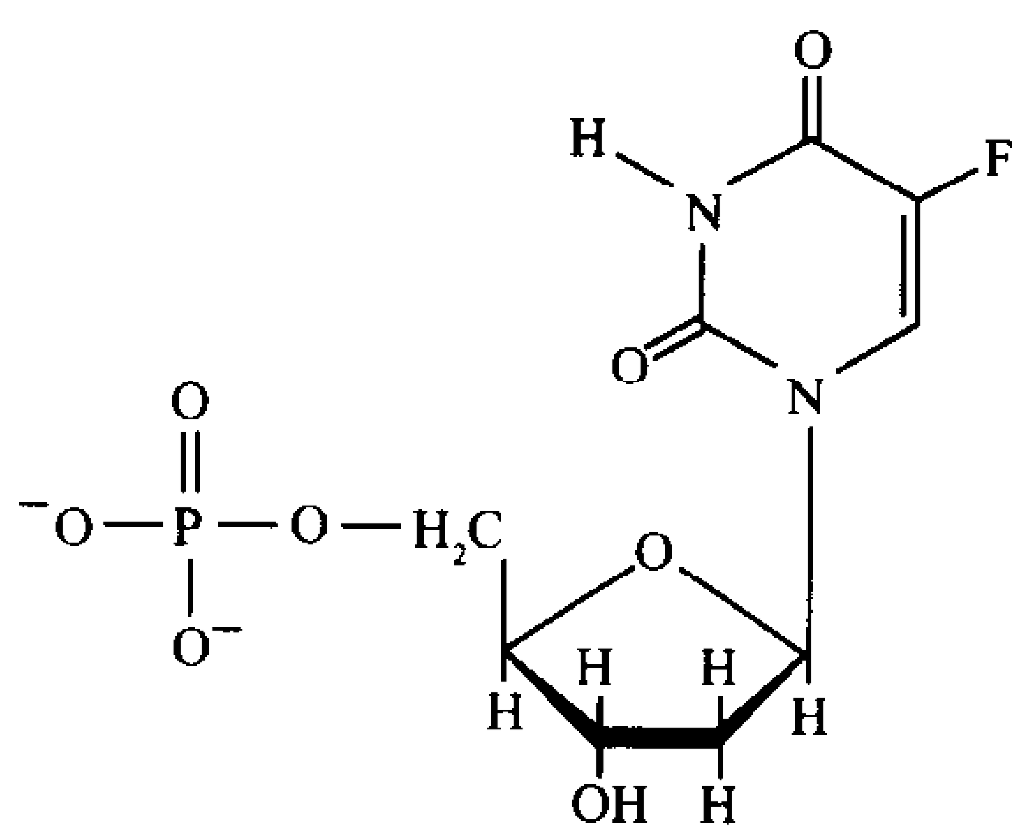
2) 丝氨酸羟甲基转移酶(节 20-4A)将丝氨酸的羟甲基转到 THF 上,生成 N^5, N^{10}-亚甲基 THF 和甘氨酸。

抑制胸苷酸合酶或 DHTR 都会阻断 dTMP 的合成,因此成为癌症化疗的基础(见框 22-1)。

框 22-1 健康和疾病的生物化学

胸苷酸合成的抑制在癌症治疗中的应用

对于快速增殖的细胞如癌细胞来说,dTMP 的合成是关键性的一步,癌细胞需要为 DNA 合成提供足量的 dTMP,因此阻断 dTMP 的合成可以杀死这些细胞。生长缓慢或根本不生长的大多数正常的哺乳动物细胞,需要较少的 dTMP,因此对抑制胸苷酸合酶或二氢叶酸还原酶的试剂敏感性较低(明显的例外是组成造血组织和许多免疫系统的骨髓细胞、肠黏膜和毛发小囊)。

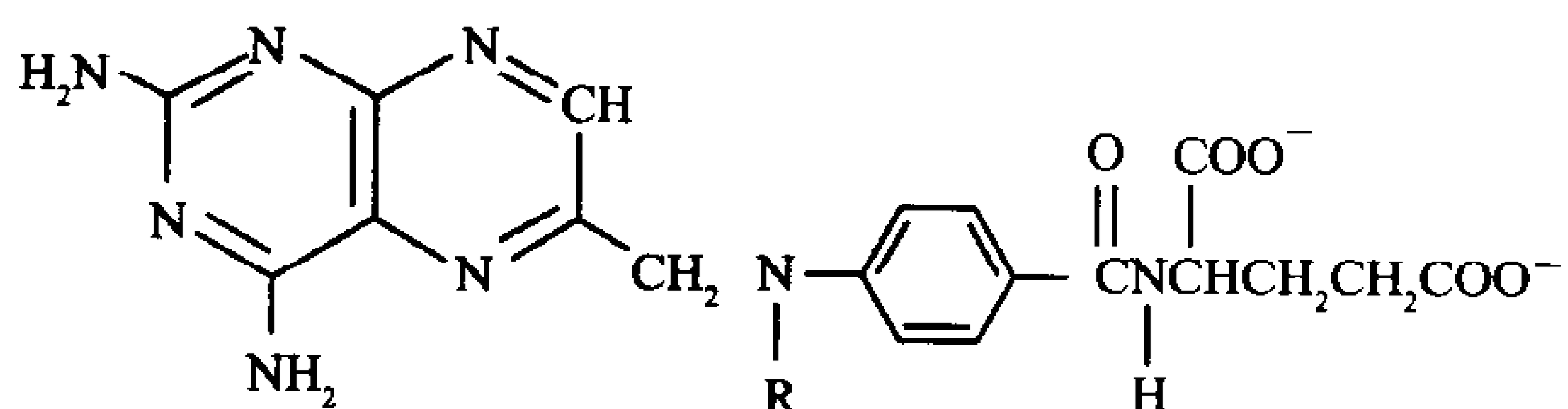


5-氟脱氧尿苷酸(FdUMP)

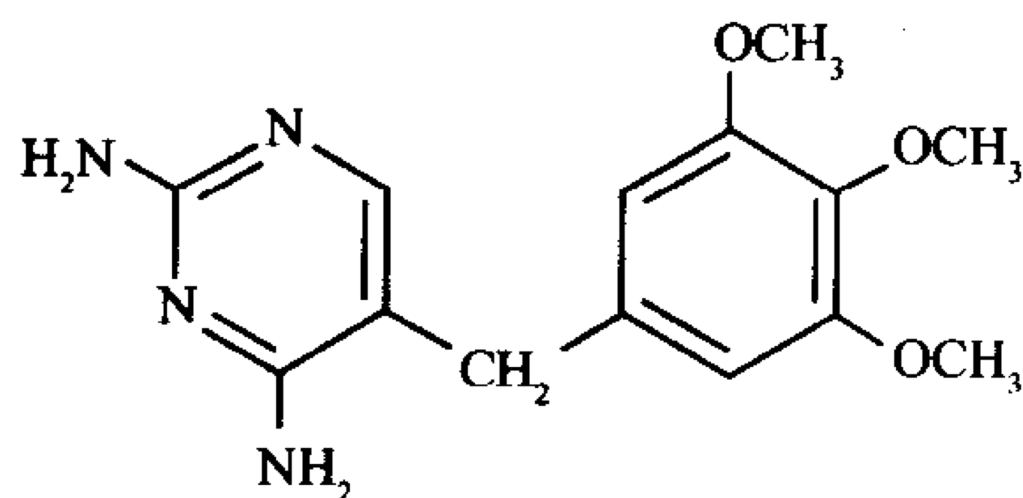
5-氟脱氧尿苷酸(FdUMP)是胸苷酸合酶的不可逆抑制剂。此化合物与 dUMP 相似,可与酶结合(氟原子并不比氢原子大多少),并进行正常酶反应的开始两步(图 22-14)。但在第三步中,酶并不能夺取氟原子的电子,使之成为 F^+(F 是电负性最强的原子),因此酶冻结在酶-FdUMP-THF 三元共价复合物中。

那些只有在进行了部分或全部正常催化反应后才使酶失活的抑制剂,如 FdUMP,被称为基于反应机制的抑制剂(或称自杀性底物,因为它们导致酶的自杀)。由于它们的专一性十分高,所以酶激活抑制剂被列为最有用的治疗药物。

DHFR 的抑制作用阻断了 dTMP 的合成,以及所有其他依赖 THF 的生物反应,因为通过胸苷酸合酶反应转变为 DHF 的 THF 不能再生。虽然氨甲蝶呤、氨基蝶呤和三甲氧苄二氨嘧啶等 DHF 类似化合物几乎不可逆地竞争性结合到 DHTR 上,其亲和力比 DHF 大 1000 倍,这些抗叶酸化合物(干扰叶酸辅因子作用的物质)是有效的抗癌剂,尤其是对付儿童白血病。实际上,一个成功的化疗方案是对癌症受害者用致死剂量的氨甲蝶呤,几小时后再给与大剂量的 5-甲酰 THF 和(或)胸苷来"挽救"病人(但希望不是挽救癌症)。由 George Hitchings 和 Gertrude Elion 发现的三甲氧苄二氨嘧啶很紧密地结合到细菌的 DHFR 上,其结合力大于对哺乳动物 DHFR 的结合,因此是临床上很有希望的抗菌剂。



R=H 氨基蝶呤
R=CH_3 氨甲蝶呤

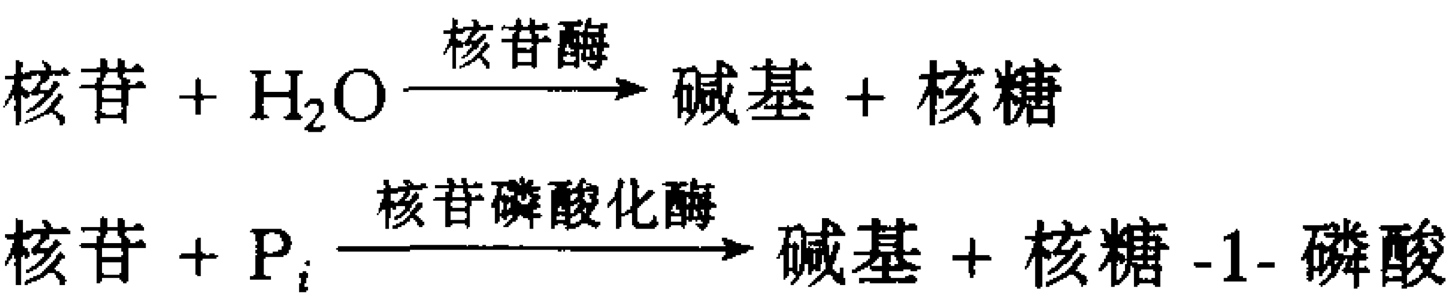


三甲氧苄二氨嘧啶

4. 核苷酸的降解

因为大多数食物都来源于细胞，因此都含有核酸。食物中的核酸在胃的酸性条件下不被降解，它们主要在小肠中被胰核酸酶和肠磷酸二酯酶降解为它们的组分——核苷酸。离子状态的核苷酸不能通过细胞膜，它们被多种基团专一性的核苷酸酶和非专一性的磷酸酶水解为核苷。核苷可直接被肠黏膜吸收，或在**核苷酶**和**核苷磷酸化酶**作用下，进一步降解为游离的碱基和核糖或核糖-1-磷酸：

713



放射性标记实验显示，摄取的核酸中的碱基仅有一小部分掺入到组织的核酸中。显然，核苷酸的从头合成途径大部分满足了生物对于核苷酸的需求，因而摄入的碱基大部分被降解和排出。细胞中的核酸，作为所有细胞组分连续转换的一部分，也是被降解的对象。在这一节中，我们将略述这些分解代谢途径，并讨论它们中几种遗传缺陷的后果。

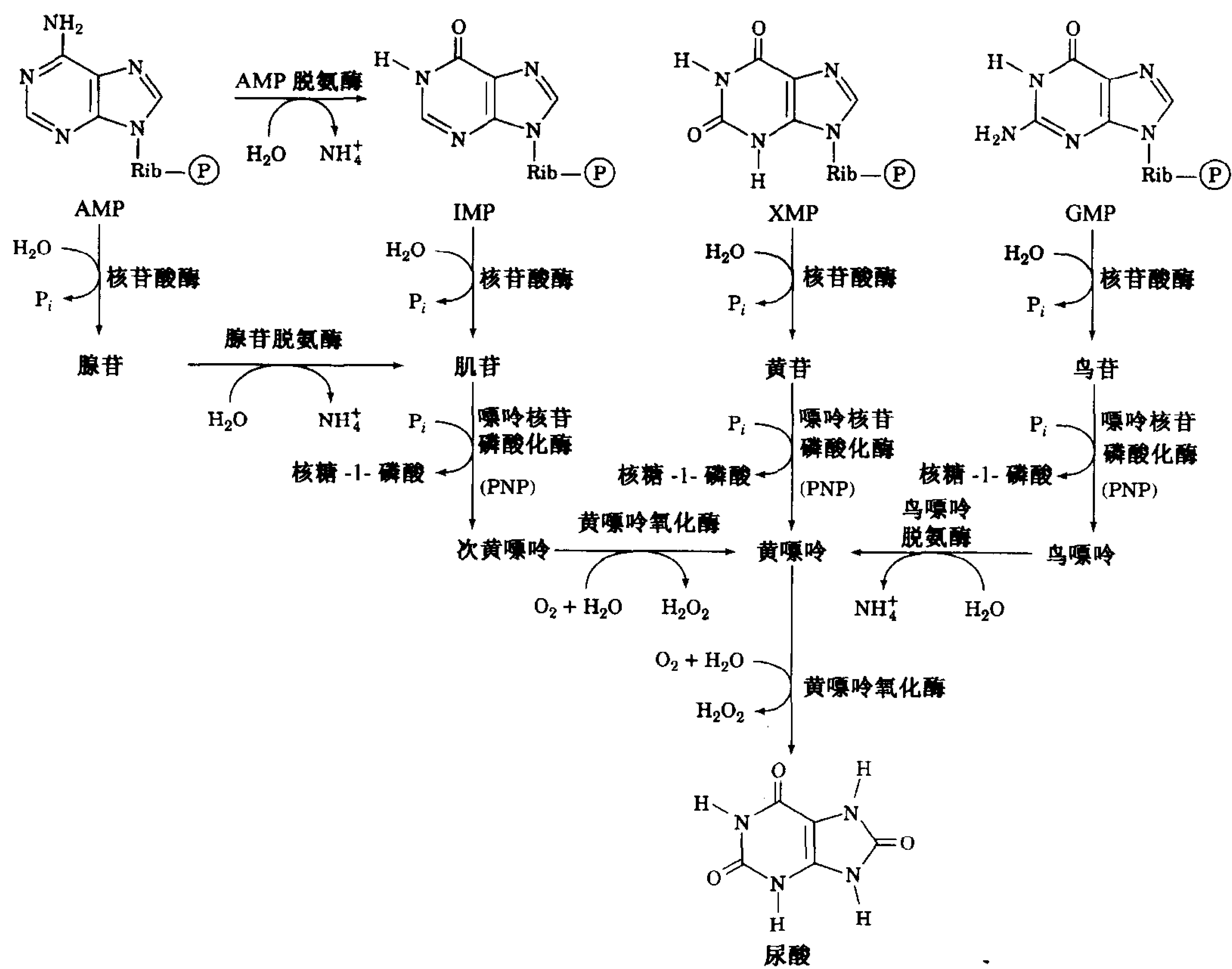


图 22-17　动物中嘌呤分解代谢的主要途径

各种不同的嘌呤核苷酸都被降解为尿酸。

714

A. 嘌呤的分解代谢

动物的嘌呤核苷酸和脱氧嘌呤核苷酸分解代谢的主要途径见图 22-17，其他生物的途径略有不同，但所有途径最终都生成尿酸。当然，途径的中间物可能通过补救反应而直接进入嘌呤核苷酸的合成。此外，**嘌呤核苷磷酸化酶**(PNP)(图 22-18)催化反应的产物核糖-1-磷酸是 PRPP 的前体。

715

腺苷和脱氧腺苷不被哺乳动物的 PNP 降解，但腺苷和腺苷酸被**腺苷脱氨酶**(ADA)和 **AMP 脱氨酶**脱去氨基，生成相应的肌苷衍生物，然后进一步被降解。

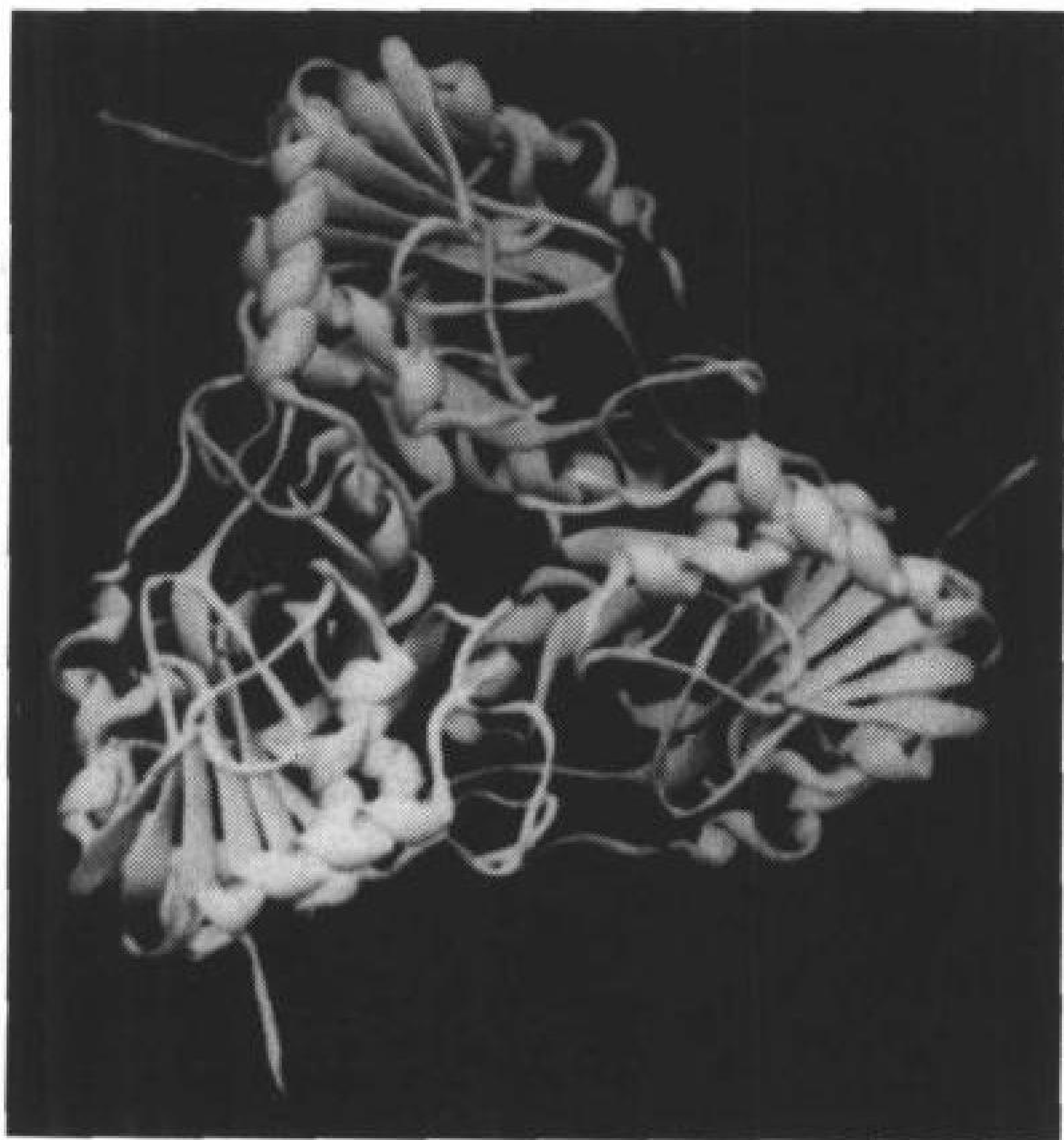


图 22-18　人红细胞嘌呤核苷磷酸化酶的 X 射线结构

每个相同亚基着以不同的颜色，黄色的亚基被显示和一个鸟嘌呤分子、两个磷酸离子形成复合物。(引自 Mike Carson, University of Alabama at Birmingham, 由 Stephen Ealick and Charles Bugg, University of Alabama at Birmingham 测定 X 射线结构)

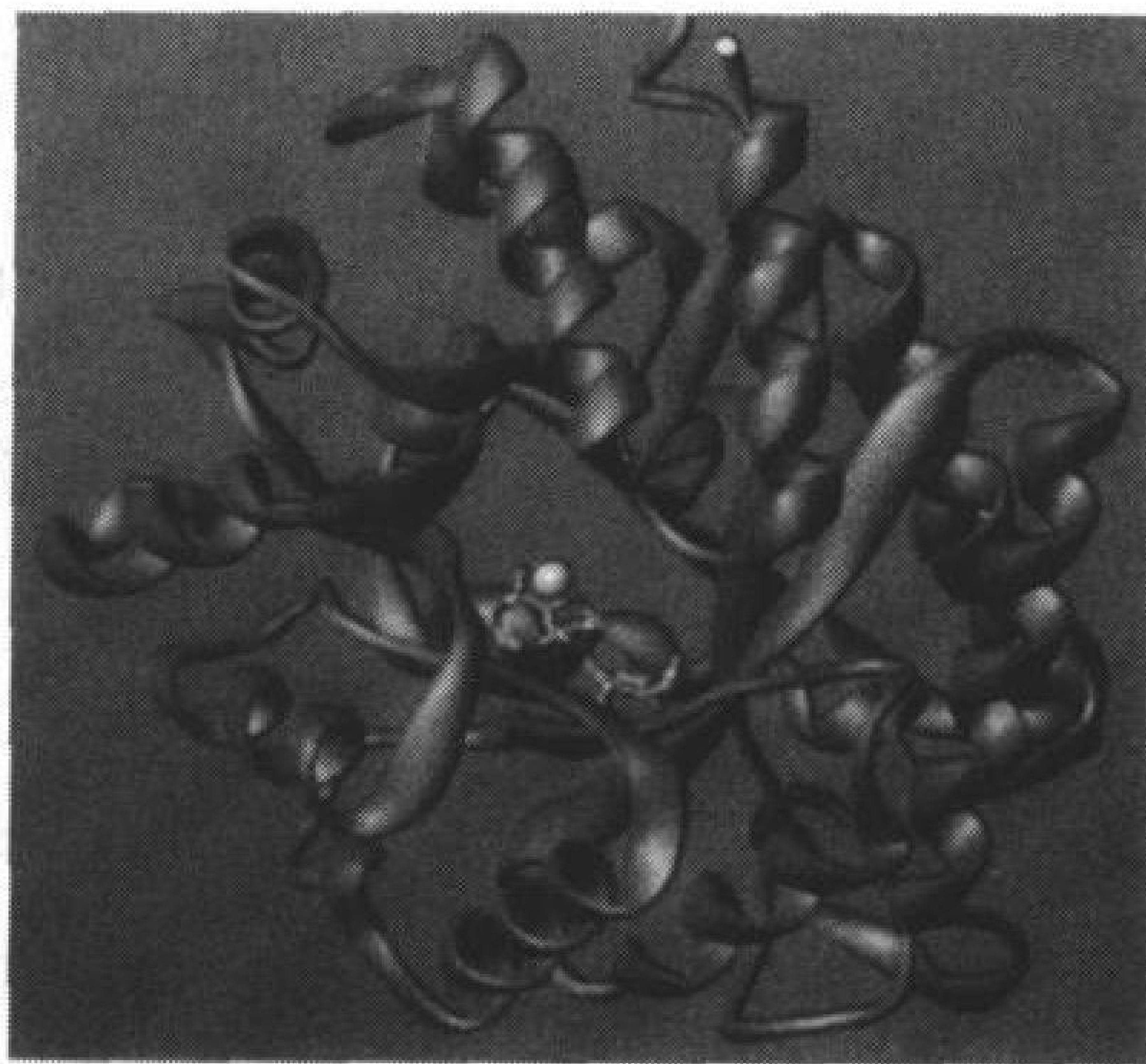


图 22-19　鼠腺苷脱氨酶的带状图

从酶 β 链的 N 端，接近沿其 α/β 桶轴向下观察。一个过渡态类似物 6-羟基-1,6-二氢嘌呤核糖核苷(HDPR)以骨架形式表示，它的碳、氮、氧原子分别为绿色、蓝色和红色。与酶结合的 Zn^{2+} 与 HDPR 的 6-羟基配位，用银色的小球表示。(引自 Florante Quiocho, Baylor College of Medicine 的 X 射线结构)

ADA 是由八股 α/β 桶组成(图 22-19)，与已知的所有 α/β 桶酶一样，它的活性中心在 β 桶 C 末端的口袋中。催化上必需的锌离子，结合在活性中心口袋的最深处，任何影响 ADA 活性中心的突变，都会导致免疫系统的紊乱(见框 22-2)。

嘌呤核苷酸循环

当 AMP 脱氨基生成 IMP 与从 IMP 合成 AMP(图 22-3，左边)相连接时，AMP 脱氨基生成 IMP 就具有从天冬氨酸脱氨基生成延胡索酸的净效应(图 22-20)。John Lowenstein 阐明这种**嘌呤核苷酸循环**在骨骼肌代谢中有重要作用。肌肉活动的增加需要柠檬酸循环活性的增加，这个过程通常是通过产生额外的柠檬酸循环中间物进行的(节 6-5B)。但是肌肉中缺乏在其他组织

716

中催化这些添补(填补)反应的大部分酶,替代的是肌肉利用嘌呤核苷酸循环产生的延胡索酸来补充它的柠檬酸循环所需的中间物。

嘌呤核苷酸循环涉及的 3 种酶的活性在肌肉中比在其他组织中高几倍,这说明嘌呤核苷酸循环在肌肉代谢中的重要性。实际上,肌肉中 AMP 脱氨酶遗传性缺陷(**肌腺苷酸脱氨酶缺乏**)的个体很容易疲劳,并经常在运动后痉挛。

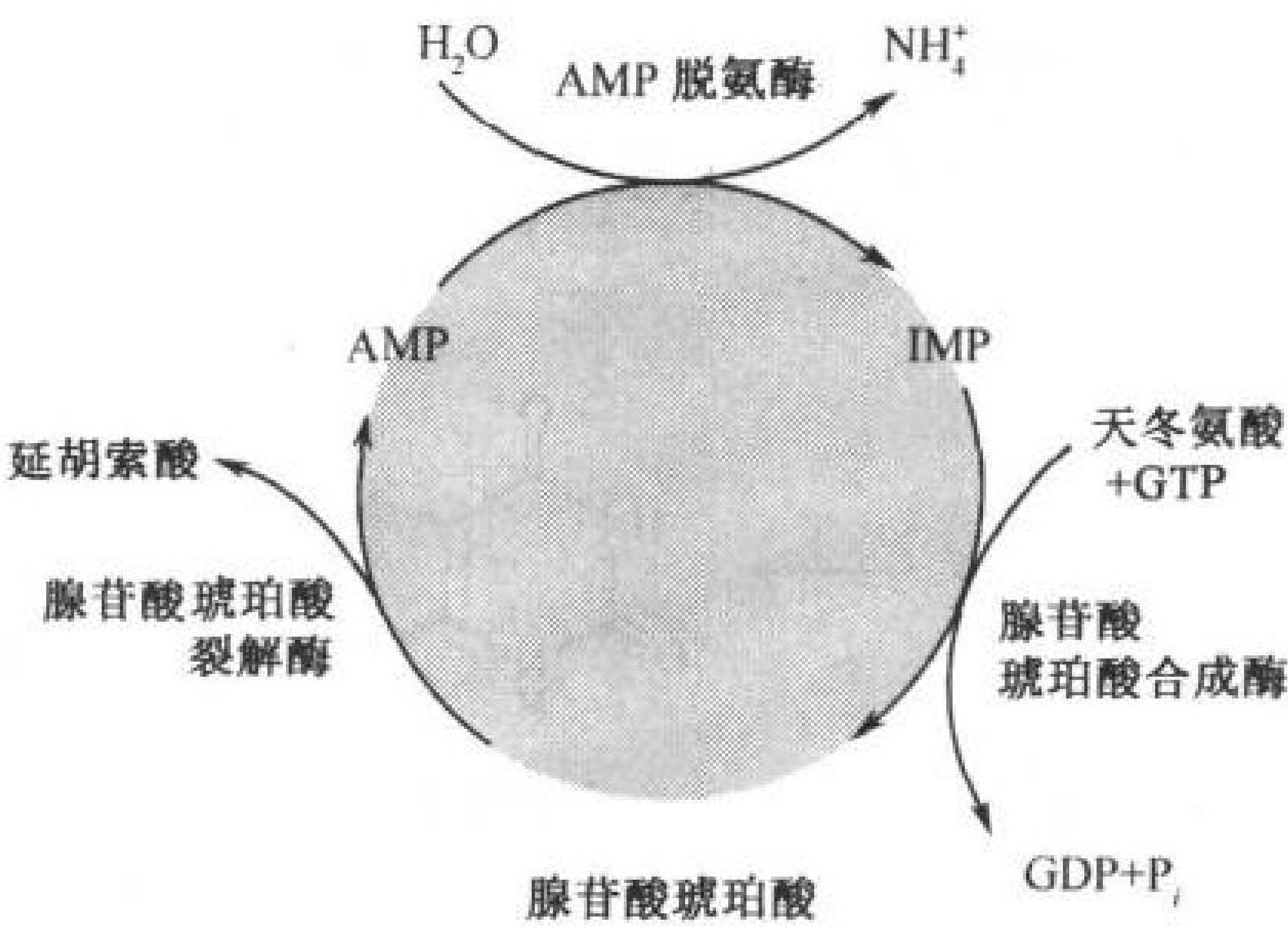




图 22-20 嘌呤核苷酸循环
在肌肉中,这个途径的功能是通过产生延胡索酸以启动柠檬酸循环。

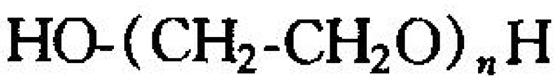
框 22-2 健康和疾病的生物化学

严重的综合性免疫缺陷疾病

罕见的腺苷脱氨酶的遗传缺陷导致的嘌呤核苷代谢异常会选择性地杀死淋巴细胞(一类白色的血细胞)。因为淋巴细胞介导了许多免疫应答,ADA 缺乏导致严重的综合性免疫缺陷疾病(SCID)。如果没有特殊的保护措施,由于严重的感染,这种病在婴儿期一定致死。从 SCID 病人中获得的 8 种已知的 ADA 突变体,都出现在结构上扰乱了 ADA 的活性中心。

生化上的考虑为 SCID 的病因提供了一个合理的解释。在缺乏有活性的 ADA 时,脱氧腺苷被磷酸化,产生高于平时 50 倍的 dATP,高浓度的 dATP 抑制了核糖核苷酸还原酶(节 22-3A),因此阻止了其他 dNTP 的合成,扼杀了 DNA 的合成,因此也阻断了细胞的增殖。ADA 缺乏对免疫系统的组织专一效应可从以下观察得到解释,即在脱氧腺苷磷酸化时,淋巴组织异常活跃。

SCID 病人的免疫系统功能可以通过注射正常 ADA 与生物学上惰性的聚乙二醇(PEG)的共价结合物得到一定程度的提高。



$$HO\text{-}(CH_2\text{-}CH_2O)_nH$$

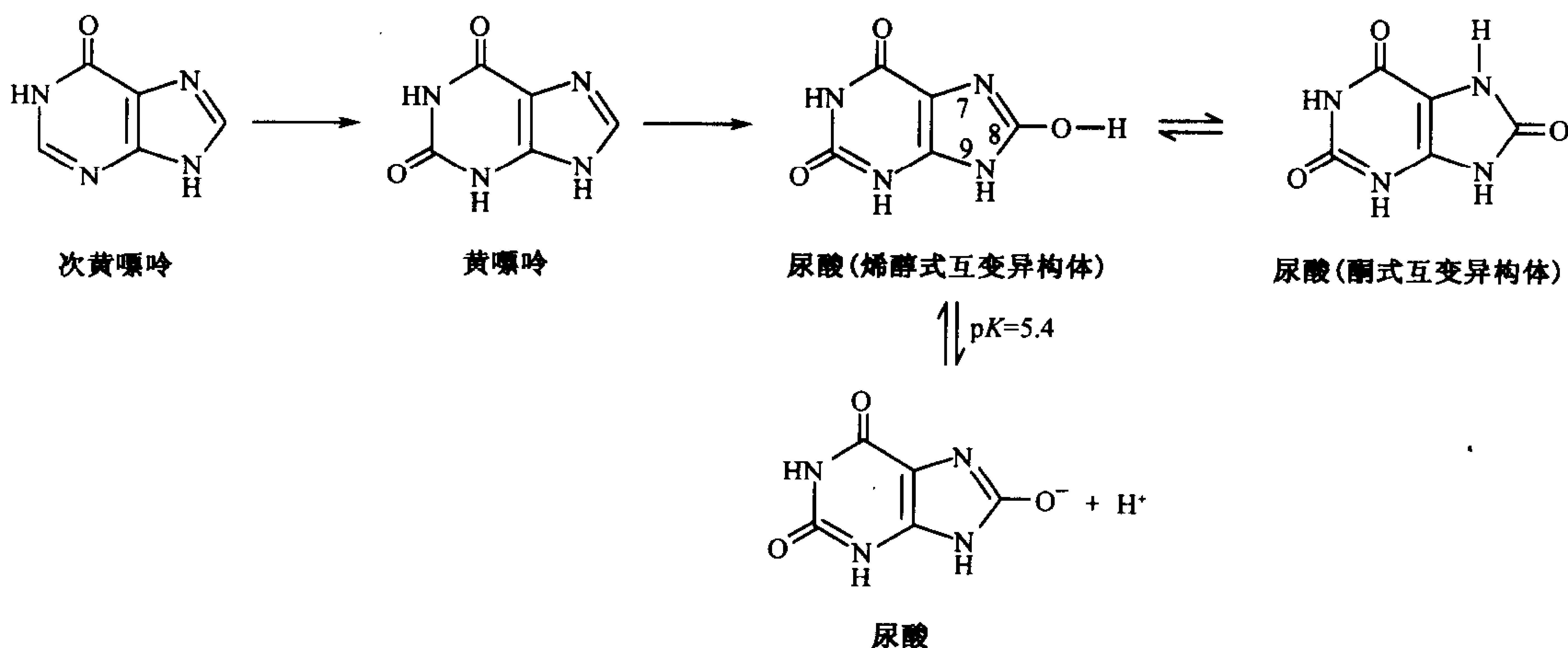
聚乙二醇

如果不加修饰,肝脏会在几分钟内将 ADA 从循环中清除,而 PEG-ADA 可在血液中保持 1～2 周。显然 PEG 可保护 ADA,避免它经由受体从血液中被滤出去。但是对 ADA 缺乏症更有效的治疗方法是基因治疗(节 3-5D)。在这方法中,从 ADA 缺乏的患儿血中抽提出淋巴细胞,在实验室中让其生长。利用基因工程技术将正常的 ADA 基因插入细胞,然后再将细胞返回到患儿体内。在一例中,产生 ADA 的细胞在患儿体内持续存活了好几年。

其他的免疫系统缺陷,来自嘌呤核苷磷酸化酶的缺乏。这个酶的缺乏,杀死了通常所说的 T 淋巴细胞,而不杀死 B 淋巴细胞,因此造成不如 SCID(T、B 淋巴细胞介导免疫应答的不同方面)严重的免疫缺陷综合症。这一观察提示,对 PNP 的选择性抑制,可能抑制与自身免疫疾病,如类风湿性关节炎、牛皮癣、胰岛素依赖的糖尿病等有关的,过高的 T 淋巴细胞活性,并阻抑如 T 细胞淋巴瘤和白血病的生长。

黄嘌呤氧化酶是一个小型的电子转运系统

黄嘌呤氧化酶将次黄嘌呤(IMP的碱基)转变为黄嘌呤,再将黄嘌呤转变为尿酸(图22-17底部)。反应产物是烯醇或尿酸(p*K*为5.4,因此称尿酸),该烯醇或尿酸互变异构为较稳定的酮式尿酸的形式。



717

在哺乳动物中,黄嘌呤氧化酶几乎全部在肝脏和小肠黏膜中。它是由完全相同的130kDa亚基组成的二聚体蛋白质,每个亚基都含有一套完整的电子转运载体系统:一个FAD、一个在Mo(IV)和它的氧化态Mo(VI)之间循环的Mo复合物、以及两个不同的Fe-S簇。最终的电子受体为O_2,O_2转变为H_2O_2,H_2O_2是一种潜在的有害的氧化剂(节17-5B),随后它在过氧化氢酶作用下转变成H_2O和O_2。

B. 尿酸的命运

人类和其他灵长类动物,嘌呤降解的最终产物是尿酸,尿酸随尿排出。鸟类、陆生爬行动物和许多昆虫也同样排出尿酸,但是这些生物并不排尿素,它们通过嘌呤的生物合成,将过量的氨基酸氮合成嘌呤,再分解为尿酸。这个氮排泄的复杂系统有一个直接的功能:它保存水分。尿酸仅微溶于水,因此只有极少量的水伴随尿酸晶体糊状物排泄出去。相反,排泄等量的水溶性极高的尿素,就渗透性地伴有大量水的排出。

在所有其他生物中,尿酸在排泄之前被进一步处理(图22-21)。除灵长类之外的哺乳动物在含Cu的**尿酸氧化酶**催化下,将尿酸氧化为它们的排泄物——**尿囊素**。硬骨鱼排泄进一步的降解产物——**尿囊酸**。软骨鱼和两栖动物在排泄之前将尿囊酸进一步降解为尿素。最后,海洋无脊椎动物将尿素分解为NH_4^+。

过多的尿酸导致痛风

痛风(gout)是一种以体内尿酸水平升高为特征的疾病。它最常见的表现是突然发作的极为痛苦的关节炎,最通常是在大脚趾(图22-22),这是由几乎不溶的尿酸钠晶体沉积造成的。尿酸钠和(或)尿酸也可以在肾脏和输尿管中沉淀为积石,导致肾损伤和输尿管道堵塞。

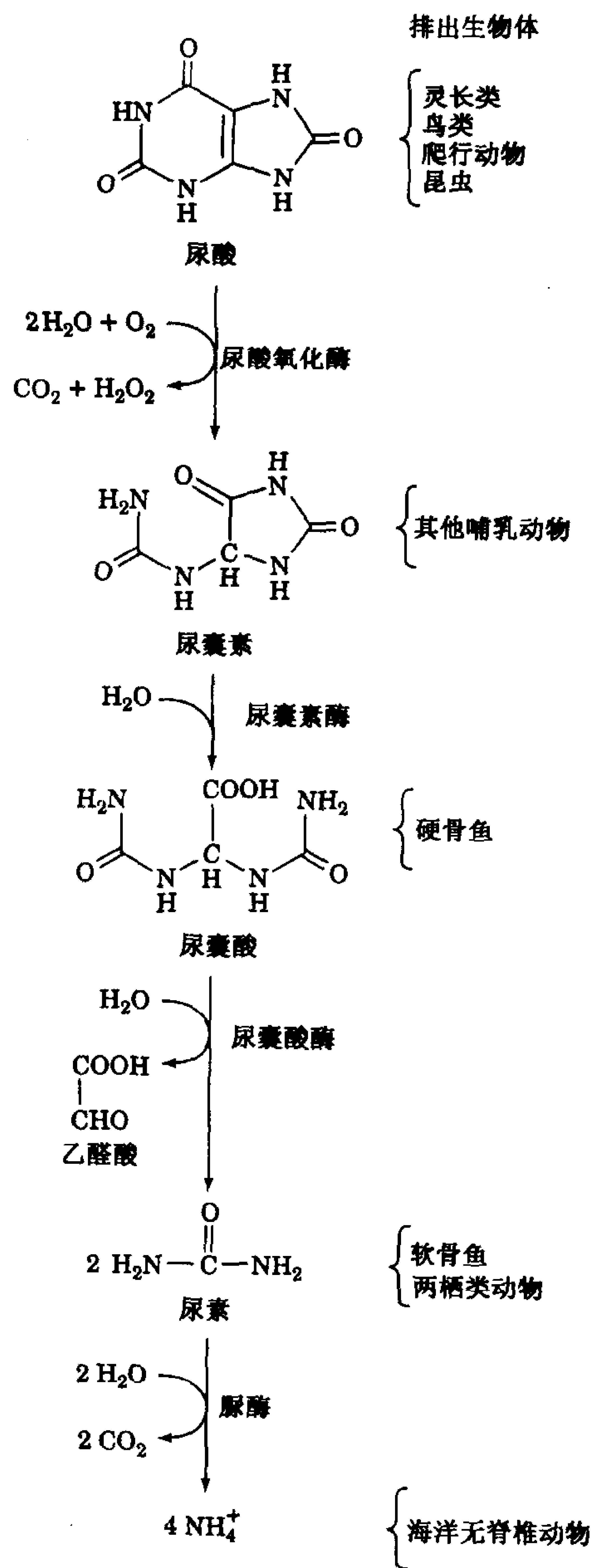


图 22-21　尿酸降解为氨

在不同物种中，这一过程终止在不同阶段，产生的含氮产物被排泄出去。

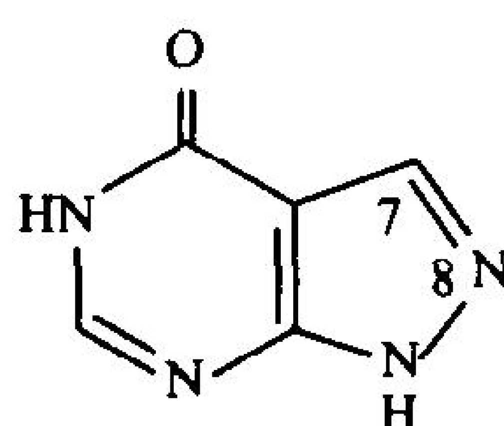
每 1000 人中约有 3 人患痛风，绝大多数为男性。传统上，虽然是不精确的，认为痛风与过分放任的饮食有关。这种关系的可能来源是在上几个世纪，酒在生产和贮存中经常会被铅污染，过度的饮酒会导致慢性铅中毒，其毒害之一是降低肾脏排出尿酸的能力。 718

痛风最常见的原因是尿酸排泄减少（虽然通常与铅中毒的原因不同）。痛风也可能是一些代谢缺陷引起的，其中大多数未被很好阐明。一个较好了解的原因是 HGPRT 缺陷（严重情况导致

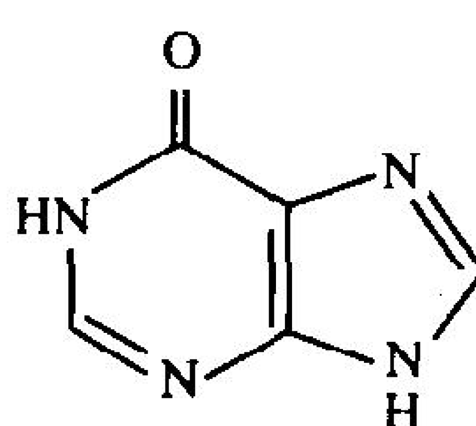
Lesch-Nyhan 综合症),通过 PRPP 的积累,导致过多的尿酸产物(节 22-1D)。



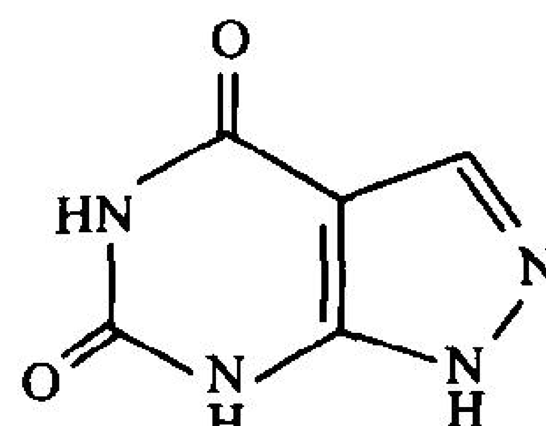
图 22-22　痛风症,James Gilroy 画的卡通
(引自 Yale University Medical Historical Library)



别嘌呤醇



次黄嘌呤



别黄嘌呤

服用黄嘌呤氧化酶的抑制剂——**别嘌呤醇**,被用来治疗痛风,别嘌呤醇是一种 N7 和 C8 位置互换的次黄嘌呤类似物。黄嘌呤氧化酶羟化别嘌呤醇,就像它羟化次黄嘌呤一样,产生**别黄嘌呤**,别黄嘌呤仍与还原型的酶紧密结合,使该酶失活。别嘌呤醇增加水溶性较好的次黄嘌呤和黄嘌呤的水平,同时降低尿酸形成的速度,从而缓解痛风的征状。虽然别嘌呤醇可以控制 Lesch-Nyhan 综合征的痛风症状,但对其神经学症状毫无作用。

C. 嘧啶的分解代谢

动物细胞将嘧啶核苷酸降解为它们的组成成分——碱基(图 22-23,上方)。这些反应与嘌呤核苷酸分解代谢类似,通过脱磷酸、脱氨基和断裂糖苷键进行。生成的尿嘧啶和胸腺嘧啶再在肝脏中通过还原降解,而不是像嘌呤分解代谢那样通过氧化降解(图 22-23,中间)。嘧啶分解代谢的最终产物 **β-丙氨酸**和 **β-氨基异丁酸**都是氨基酸,就像氨基酸那样参加代谢。它们通过转氨基和活化反应转变成丙二酸单酰 CoA 和甲基丙二酸单酰 CoA(图 22-23,左下方)。丙二酸单酰 CoA 是脂肪酸合成的前体(图 19-22),而甲基丙二酸单酰 CoA 转变成柠檬酸循环的中间物,琥珀酰 CoA(图 19-13)。因此,在一定程度上嘧啶核苷酸的分解代谢有利于细胞的能量代谢。

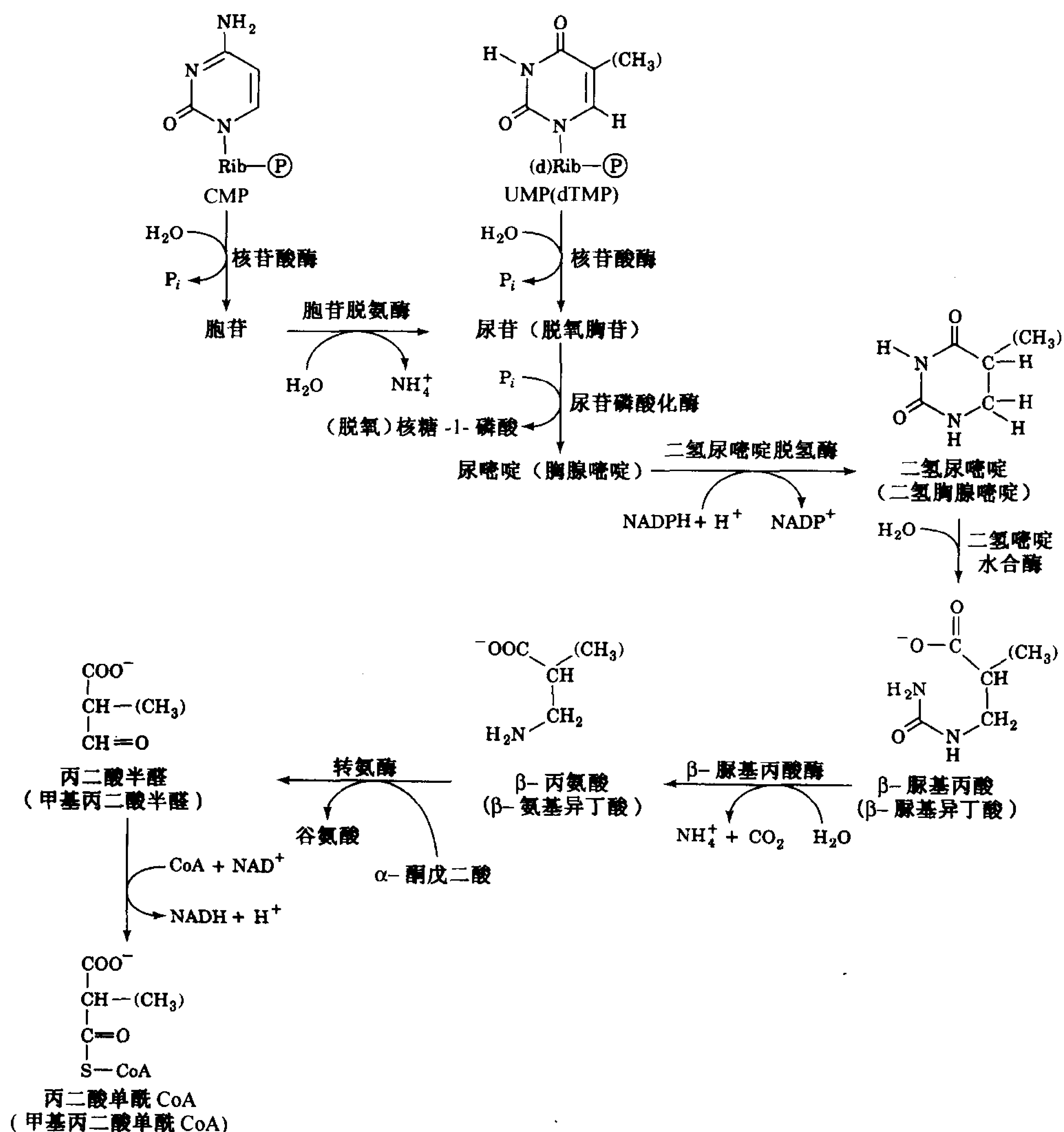


图 22-23　动物的嘧啶分解代谢的主要途径

这些反应生成的氨基酸被其他代谢途径摄取。UMP 和 dTMP 被相同的酶降解；dTMP 的降解途径在圆括号中表示。

小　结

1. 嘌呤核苷酸 IMP 是由核糖-5-磷酸、天冬氨酸、延胡索酸、谷氨酰胺、甘氨酸和 HCO_3^- 通过 11 步反应合成。嘌呤核苷酸合成在它的第一步和第二步被调节。
2. IMP 是 AMP 和 GMP 的前体，AMP 和 GMP 磷酸化生成相应的二磷酸和三磷酸产物。
3. 嘧啶核苷酸 UMP 是由 5-磷酸核糖焦磷酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和 HCO_3^- 通过 6 步反应合成。UMP 通过磷酸化和氨基化转变成 UTP 和 CTP。
4. 在细菌中，嘧啶核苷酸生物合成是在 ATCase 这步被调节，而在动物中是在氨甲酰磷酸合成酶 II 催化的这步被调节。

5. 脱氧核苷二磷酸是从相应的 NDP 通过核糖核苷酸还原酶的作用而合成，核糖核苷酸还原酶含有一个双核 Fe(III)辅基、酪氨酰自由基和几个氧化还原活性的巯基。该酶的活性是通过与硫氧还蛋白或谷氧还蛋白的二硫键交换而再生。
6. 核糖核苷酸还原酶是通过别构效应物调节的，从而保证了脱氧核苷酸的合成量能够满足 DNA 合成的需要。
7. dTMP 是通过胸苷酸合成酶从 dUMP 合成的。在这反应中，通过二氢叶酸还原酶(DHFR)的作用，将二氢叶酸还原回到四氢叶酸。
8. 嘌呤核苷酸通过核苷酶和嘌呤核苷磷酸化酶(PNP)降解。腺嘌呤核苷酸在腺苷脱氨酶和 AMP 脱氨酶作用下脱氨。在肌肉中，嘌呤核苷酸循环中的 AMP 的合成和降解都生成柠檬酸循环的中间物——延胡索酸。黄嘌呤氧化酶催化次黄嘌呤为黄嘌呤，以及将黄嘌呤氧化为尿酸。
9. 人类嘌呤降解的终产物是尿酸，并被排泄出去。其他生物进一步降解尿酸。
10. 嘧啶降解为脂肪酸代谢的中间物。

参考文献

Carreras, C.W. and Santi, D.V., The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase, *Annu. Rev. Biochem.* **64,** 721–762 (1995).

Jordan, A. and Reichard, P., Ribonucleotide reductases, *Annu. Rev. Biochem.* **67,** 71–98 (1998).

Mao, S.S., Holler, T.P., Yu, G.X., Bollinger, J.M., Jr., Booker, S., Johnston, M.I., and Stubbe, J., A model for the role of multiple cysteine residues involved in ribonucleotide reduction: Amazing and still confusing, *Biochemistry* **31,** 9733–9743 (1992).

Nordlund, P. and Eklund, H., Structure and function of the *Escherichia coli* ribonucleotide reductase protein R2, *J. Mol. Biol.* **232,** 123–164 (1993); *and* Uhlin, U. and Eklund, H., Structure of ribonucleotide reductase protein R1, *Nature* **370,** 533–539 (1994).

Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D., Stanbury, J.B., Wyngaarden, J.B., and Frederickson, D.S. (Eds.), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease* (7th ed.), Chapters 49–55, McGraw-Hill (1995). [These chapters describe normal and abnormal pathways of nucleotide metabolism.]

Smith, J.L., Enzymes of nucleotide synthesis, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5,** 752–757 (1995).

Zalkin, H. and Dixon, J.E., *De novo* purine nucleotide biosynthesis, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **42,** 259–285 (1992).

关 键 词

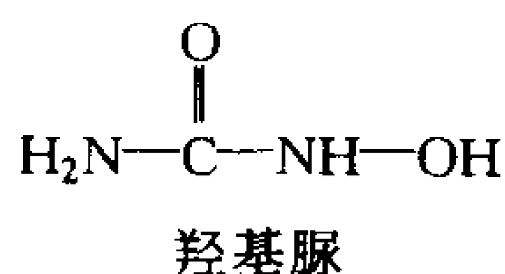
5-磷酸核糖-α-焦磷酸　PRPP
前馈激活　feedforward activation
嘌呤核苷酸循环　purine nuclcotide cycle
基于反应机制的抑制剂(自杀底物)　mechanism-based inhibitor
磺胺　sulfonamides
补救途径　salvage pathway

学习思考题

1. 复习碱基、核苷和核苷酸的命名。
2. 从以下几个方面比较嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸的合成途径：
   (a)前体，(b)能量消耗，(c)核糖部分的获得，(d)酶促步骤的数目。
3. PRPP 的水平如何影响嘌呤和嘧啶核苷酸的合成？
4. 叶酸辅因子在核苷酸代谢中的作用是什么？
5. 为什么抗叶酸物是有效的药物？
6. 描述 Lesch-Nyhan 综合征、乳清酸尿症、严重的综合性免疫缺陷综合征(SCID)和痛风的代谢缺陷。
7. 细胞是如何平衡(a)嘌呤核苷酸和嘧啶核苷酸(b)核糖核苷酸和脱氧核糖核苷酸的生成？
8. 嘌呤和嘧啶降解时会生成哪些化合物？

练　习　题

1. 以 ATP 为当量，计算从头合成(a)IMP(b)AMP(c)CTP 时所消耗的能量。假设所有的底物(如核糖-5-磷酸和谷氨酰胺)和辅助因子都具备。
2. 某些谷氨酰胺类似物不可逆地使结合谷氨酰胺的酶失活，指出在这些化合物存在时，积累的核苷酸生物合成的中间产物。
3. 供给大鼠碱基和核糖都被^{14}C标记的胞苷，然后将它们的 DNA 抽提出来，并用核酸酶降解。如果细胞中脱氧胞苷酸的生成经历以下途径：(a)完整的 CDP 被还原为 dCDP(b)CDP 在还原之前降解为胞嘧啶和核糖，试描述回收的脱氧胞苷酸残基的标记模式。
4. 解释为什么破坏酪氨酰自由基的羟基脲是一种有用的抗肿瘤剂。

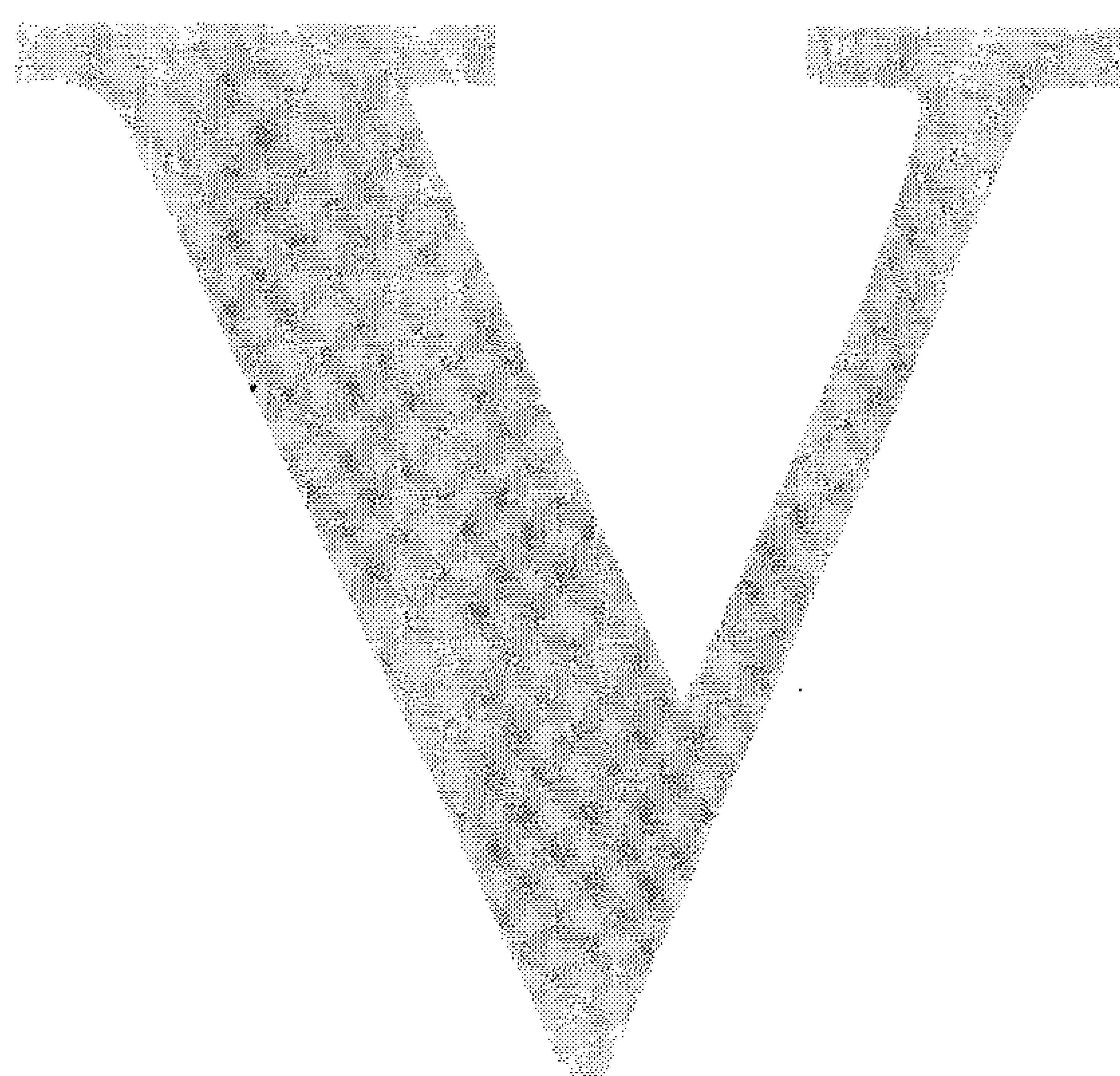


羟基脲

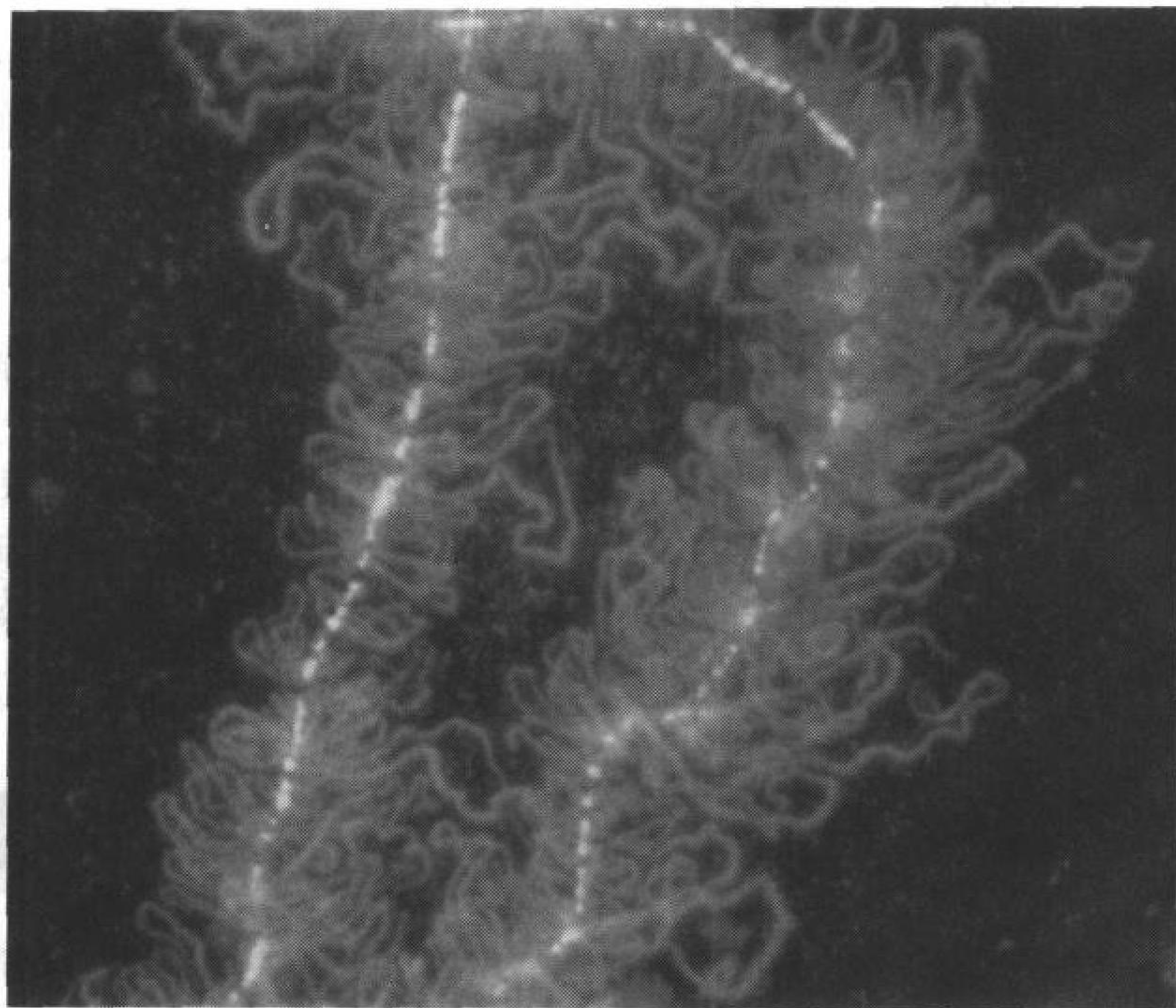
5. 为什么脱氧腺苷对哺乳动物细胞有毒？
6. 为什么用 FdUMP 或氨甲蝶呤化疗的人会暂时秃头？
7. 解释为什么正常细胞在含有胸苷和氨甲蝶呤的营养培养基中会死亡，而胸苷酸合成酶缺乏的突变细胞却可存活并生长。
8. 解释为什么氨甲蝶呤抑制组氨酸和甲硫氨酸的合成。
9. 解释以下物质是否是酶激活抑制剂：
   (a)细菌二氢叶酸还原酶伴同三甲氧苄二氨嘧啶。
   (b)黄嘌呤氧化酶伴同别嘌呤醇。
10. 为什么 von Gierke 的糖原贮存病(框 15-2)会导致痛风的症状？

(南京大学　陈钧辉　译)

第五篇　基因表达和复制



第23章　核酸结构



通过结合在DNA上的蛋白质可以来"解读"编码在DNA中的信息。即使DNA分子成环状以增加其对蛋白质的可接近性，蛋白质也必须能够识别特定的核苷酸序列。上图所示环状DNA片段是水螈卵母细胞染色体的一部分。(引自 Roth. M. B., Gall. J. G., J. Cell Biol. 105, 1049(1987)，版权归 Rockefeller 大学出版社)

726 在每个生物体中，核酸是生物信息的根本来源。广义来说，独立细胞的结构和活性由 DNA（某些病毒中是 RNA）中所包含的基因结构所决定。根据分子生物学中心法则（节 3-3B），DNA 中的核酸碱基序列编码蛋白质中的氨基酸序列。许多细胞蛋白是进行新陈代谢过程中的酶，这已经在第 14～22 章中作过讨论，其他一些蛋白质扮演结构或控制的角色，或是直接参与维持和转达基因信息的过程。

有两类核酸：DNA 和 RNA，它们储存信息并使信息为细胞所利用，这些分子的结构必须：

1）基因信息必须储存在一个大小上易于管理并能长时间稳定存在的结构上。

2）基因信息必须能被多次解码。**转录**（transcription）是将 DNA 中核苷酸序列拷贝到 RNA 上的过程，以使它们能指导称之为**翻译**（translation）的蛋白质合成。

3）包含在 DNA 或者 RNA 中的信息必须是能被蛋白质和其他核酸所接近，这些物质必须能识别核酸（在大多数情况下以特定序列的方式）并与之结合以改变其功能。

4）生物体的子代必须具有与其父代相同的结构。因此，DNA 是可精确**复制**（replicate）的，它使每个子体都获得相同的信息。

正如我们将看到的，完成所有核酸的功能需要许多细胞组分参与。核酸很难说是一个惰性的“只供阅读”实体，特别是 RNA，它具有单链结构，它是在大量解码基因信息的过程中提供脚手架和催化作用的动态分子。在本章中，我们将重点讨论核酸的结构性质，包括为实现其功能而与蛋白质之间的相互作用。在后续的几章中，我们将讨论核酸的复制（第 24 章）、转录（第 25 章）、翻译过程（第 26 章）。

1. DNA 螺旋

为了解 DNA 分子是如何在易受影响的条件下保护基因信息的，我们将通过观察 DNA 的各种形式开始对核酸结构的讨论。

A. DNA 几何学

DNA 是由磷酸二酯键连接起来的脱氧核糖核酸的双链聚合物（图 3-6 和图 3-11）。**B-DNA** 是 DNA 中最常见的生物形态，该结构最初由 James Watson 和 Francis Crick 所阐明（节 3-2B）。

1）两条反平行多核苷酸链围绕共同的螺旋轴以右手螺旋盘绕，形成直径约 20Å 的双螺旋。

727 2）形成氢键对的核酸碱基平面几乎垂直于螺旋轴。在 B-DNA 中，碱基位于螺旋的中心，糖-磷酸骨架则在外侧，形成所谓的大沟和小沟，仅有碱基对的外侧暴露在溶液中。

3）不管碱基的组成如何，每个碱基对都有近似的宽度（图 23-1），这可以解释 DNA 分子是近乎完美的对称结构。A·T 和 G·C 碱基对是可以互换的：*它们可以相互交换而不改变糖-磷酸骨架中 C1′碳原子的位置*。同样的，Waston-Crick 碱基对也是可以交换的（例如，G·C 变为 C·G 或者 T·A 变为 A·T）。相反，碱基的其他组合都将对双螺旋造成显著的破坏。

4）“理想”的 B-DNA 每一圈螺旋中包括 10 个碱基对，每个相邻的碱基对之间旋转 36°，由于芳香族碱基的范德华距离为 3.4Å 并相互部分重叠，因此双螺旋的螺距为 34Å。有几种不同结构的 DNA 双链，它依赖于溶剂组成和碱基序列。DNA 最主要的结构变体是 **A-DNA** 和 **Z-DNA**。这些分子的几何参数列在表 23-1 中，几何构型如图 23-2 所示。

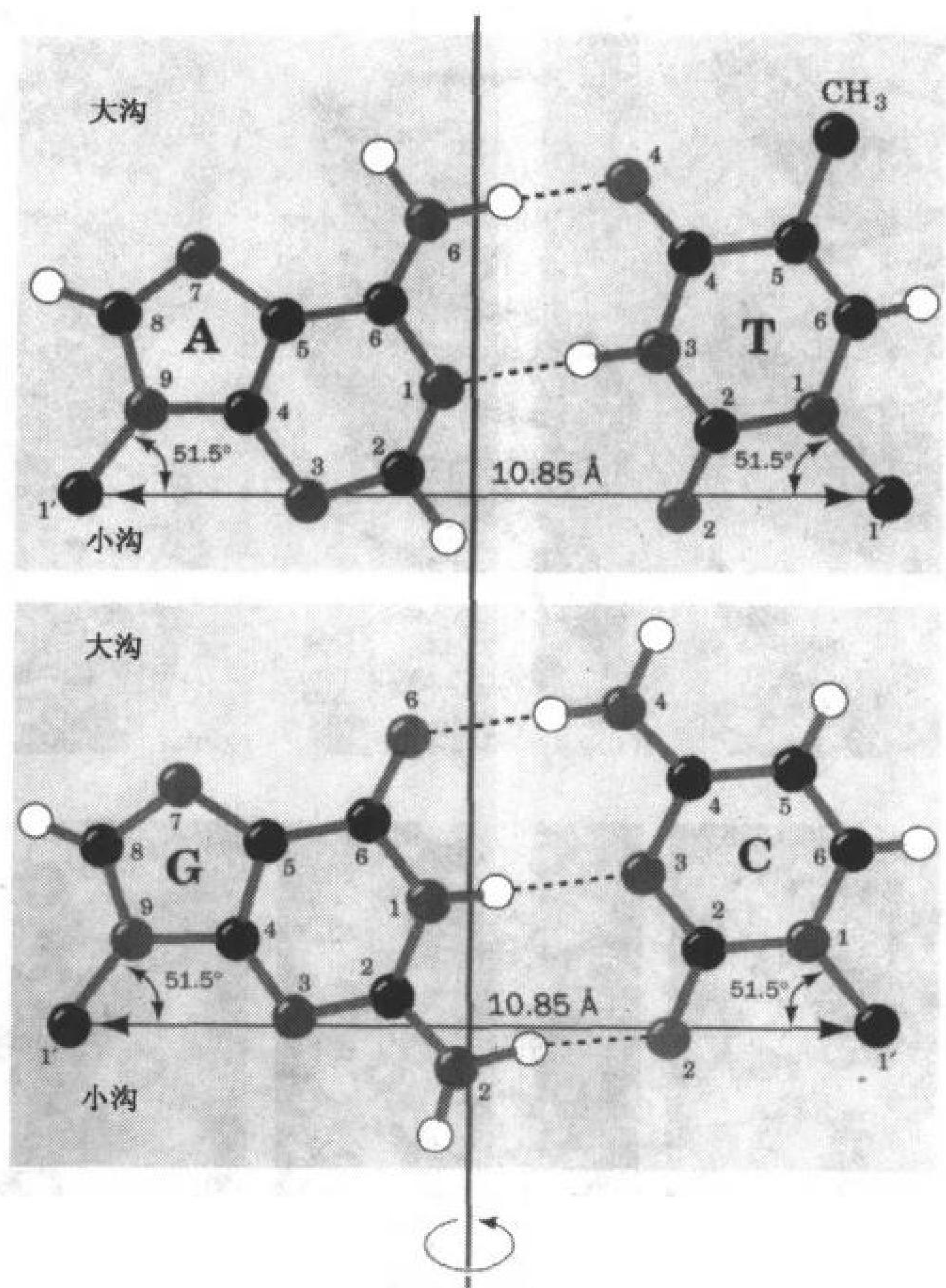


图 23-1　Watson-Crick 碱基对

A·T 和 G·C 碱基对与 C1′原子结合的连线具有相同的距离，糖苷键与碱基之间的夹角也相等。这使 DNA 具有假二次旋转对称轴(红线)，它穿过每个碱基对的中心并与螺旋轴垂直。[引自 Arnott, S., Dover, S.D., 和 Wonacott, A.J., *Acta Cryst*. B25, 2196(1969)]

表 23-1　理想的 A-DNA, B-DNA 和 Z-DNA 的结构参数

	A	B	Z
螺旋	右旋	右旋	左旋
直径	~26Å	~20Å	~18Å
每螺旋内的碱基数	11	10	12(6 个二聚物)
每碱基对旋转角	33°	36°	60°(每二聚物)
螺距(每圈上升)	28Å	34Å	45Å
每个碱基对螺旋上升	2.6Å	3.4Å	3.7Å
碱基与螺旋轴的倾斜角	20°	6°	7°
大沟	窄而深	宽而深	平坦
小沟	宽而浅	窄而深	窄而深
糖的折叠	C3′-内	C2′-内	对嘧啶为 C2′-内；对嘌呤为 C3′-内
糖苷键	反	反	对嘧啶为反，对嘌呤为顺

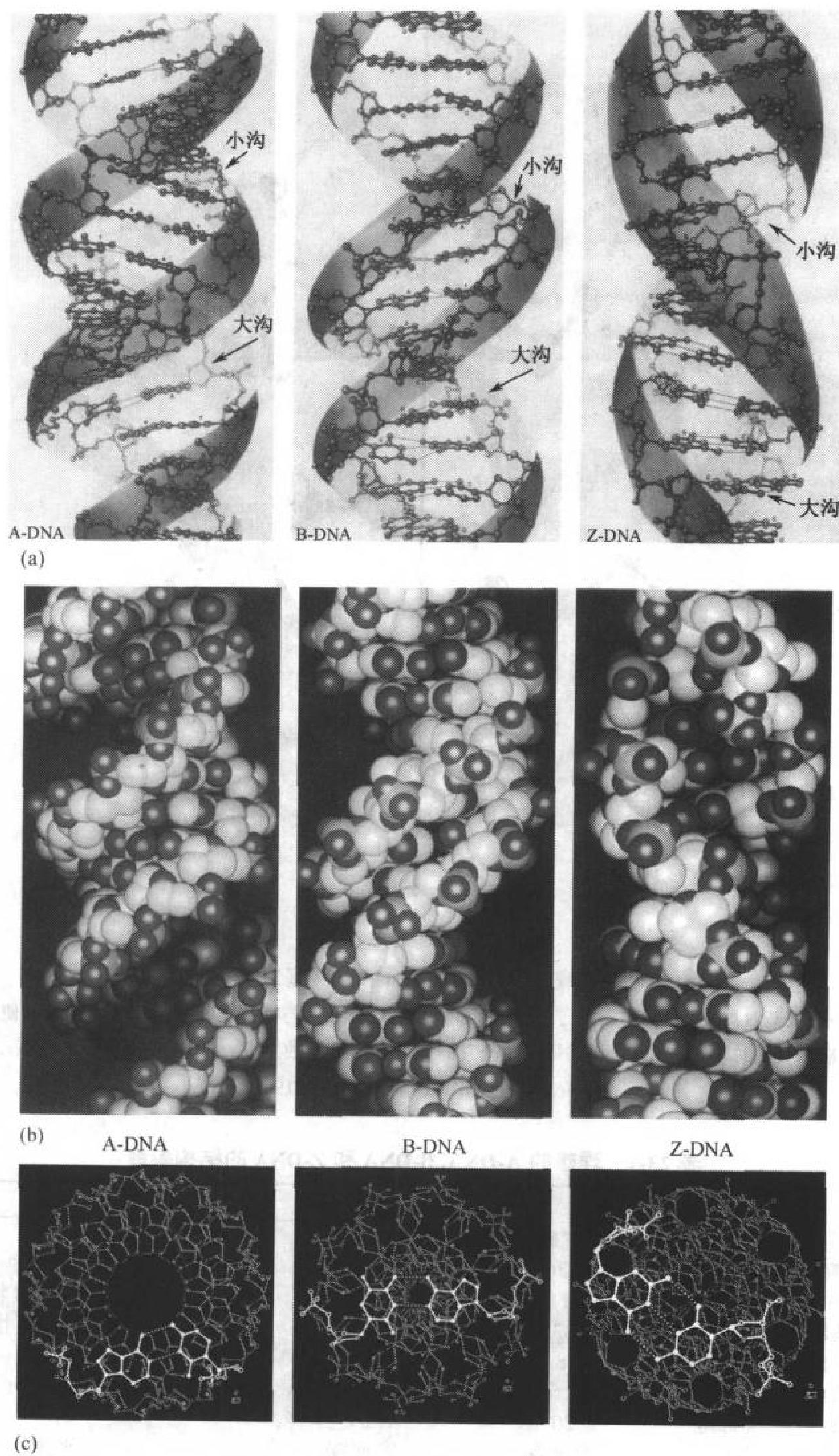


图 23-2 A-DNA,B-DNA 和 Z-DNA 结构

(a)垂直于螺旋轴观察。糖-磷酸骨架由蓝-绿色飘带表示,碱基由红色表示。(b)空间填充模型。C、N、O 和 P 原子分别由白色、蓝色、红色和绿色表示,为清楚起见忽略了 H 原子。(c)从顶端沿螺旋轴观察。糖环 O 原子红色表示,最近的碱基对为白色。由 Irving Geis 所画。

A-DNA 碱基向螺旋轴倾斜

在脱水条件下，B-DNA 经过一可逆构象变化变为 A-DNA，该构象比 B-DNA 具有更宽和平坦的右手螺旋。A-DNA 每圈螺旋内有 11 个碱基对，螺距为 28Å，并在轴向形成一空洞(图 23-2c，左)，然而 A-DNA 最显著的特征是其碱基对平面与螺旋轴的夹角为 20°。因其螺旋轴并不穿过碱基，A-DNA 具有深的大沟和非常浅的小沟；可以将其描述为围绕一直径为 6Å 的柱形空洞的平展丝带。

729

730

Z-DNA 形成左手螺旋

在 Waston-Crick DNA 结构发现 25 年后，在一个常见系统中偶然发现它呈现出乎意料的性质。Andrew Wang 和 Alexander Rich 在测定 d(CGCGCG)晶体结构时发现它为一左手螺旋。这一被称之为 Z-DNA 的结构每圈螺旋中有 12 个 Waston-Crick 碱基对，螺距为 45Å，有一个很深的小沟，没有可辨识蹬大沟。因此 Z-DNA 类似于左手旋钻头(图 23-2，右)。

纤维衍射及 NMR 研究表明，交替出现嘌呤和嘧啶的互补聚核苷酸，例如 poly d(GC)·poly d(GC)或者 poly d(AC) ·poly d(GT)，在高浓度盐溶液中呈现 Z 构象。相对于 B-DNA，盐通过减小处于相反链上最接近的磷酸基团(在 Z-DNA 中相距 8Å，在 B-DNA 中相距 12Å)之间的静电排斥作用来稳定 Z-DNA。

Z-DNA 的生物学重要性是什么？Rich 提出在适当环境下，B-DNA 的特定片段向 Z-DNA 的可逆转变在调节基因表达中扮演着开关的角色。然而，在体内证明 Z-DNA 的存在是非常困难的，主要问题是需要证明检测 Z-DNA 的特定探针，例如 Z-DNA 特异抗体，本身并不会导致B-DNA呈现为 Z 构象——这就是一种生物不确定性原则(即测量过程本身不可避免地干扰被测量体系)。

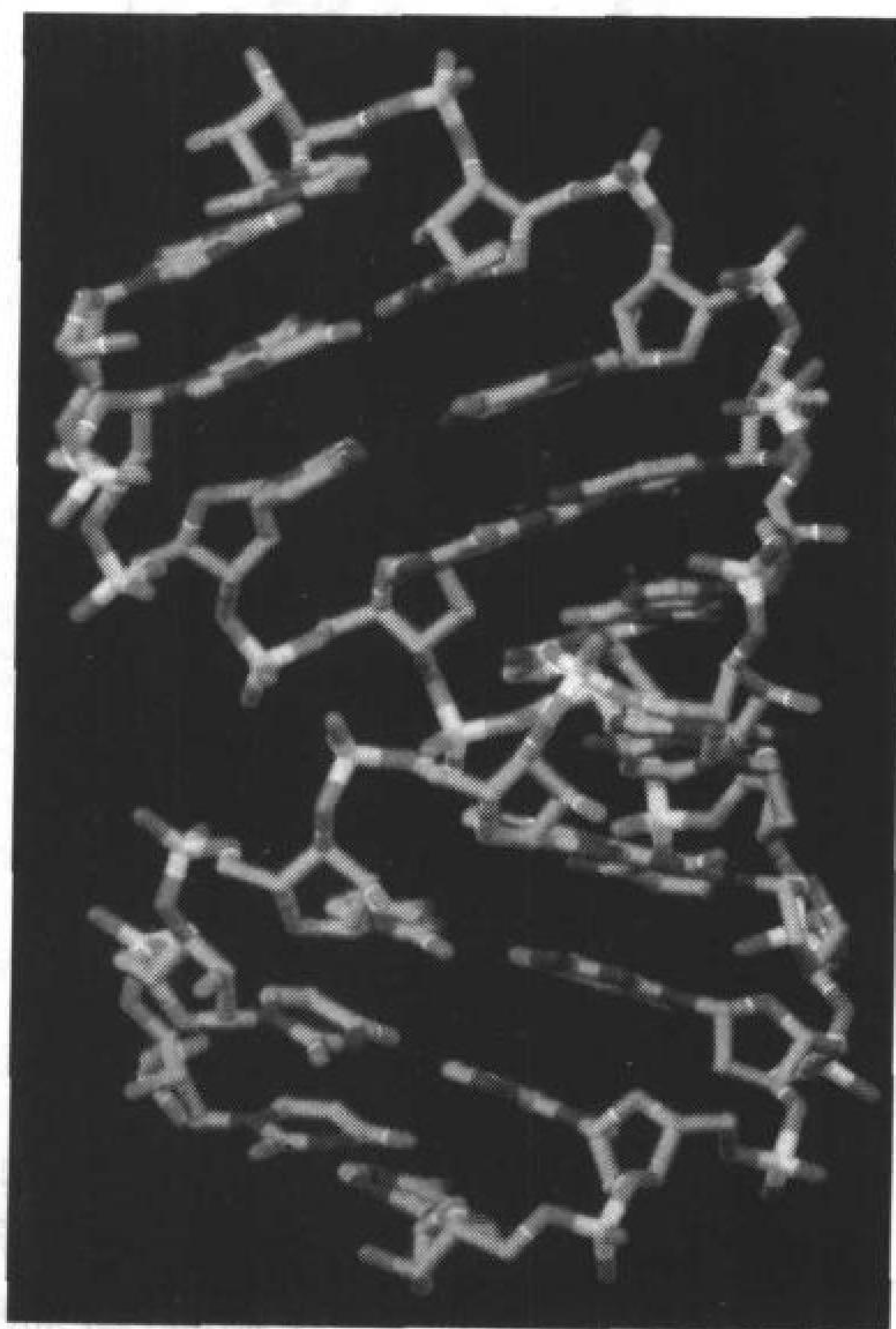


图 23-3　10 个碱基对的 RNA-DNA 杂交链的 X 射线结构　它是由 RNA 5′-UUCGGGCGCC-3′及与其碱基对互补的 DNA 链构成，虽然其 DNA 链具有类 B 构型，但它却形成了 A 型双螺旋。以棍棒图示出此结构，RNA 碳原子为青色，DNA 碳原子为绿色，氮原子为蓝色，氧原子除 RNA 2′氧原子为品红色外其余均为红色，磷原子为金色。(引自 Barry Finzel, Pharmacia & Upjohn 发现的 X 射线结构, Inc., Kalamazzo, Michigan)

RNA 能形成螺旋

双链 RNA 是某些病毒的基因物质，但其仅仅由单链合成。尽管如此，单链 RNA 能自身折叠以使碱基对互补序列排列形成带有单链环的双链杆(图 3-12)。因 2′-OH 基团的空间位阻使得双链 RNA 并不能形成类似 B-DNA 的构象，而呈现类似 A-DNA 的构象(图 23-2)，每圈螺旋约 10.6 碱基对，螺距约 26.5Å，碱基对与螺旋轴之间的倾斜角约为 16°。

杂交双螺旋是由一条 RNA 链和一条 DNA 链构成的，其表观上呈现类 A-DNA 构象(图 23-3)。RNA-DNA 杂交螺旋常出现在

由 RNA 小片段引发 DNA 复制的起始阶段(节 24-1),以及在 DNA 模板上转录 RNA 的过程中(节 25-1C)。

B. DNA 柔性

迥然不同的 3 种 DNA 结构 A、B 和 Z 在体内并不能随意转变。从一种构象转换到另一种构象需要如低湿度那样的特殊物理条件,或是 DNA 结合蛋白的影响。此外,真实 DNA 分子与上节所描述的理想模型也有偏差。B-DNA 片段的 X 射线衍射结构揭示出,*个别残基明显不同于依赖顺序排列而成的平均构象*。例如,每个碱基对旋转的角度范围为 28°～42°,每个碱基对也可像螺旋桨一样旋转或扭曲而偏离其理想构象。在基因信息表达过程中,对于蛋白识别 DNA 特定序列,这些构象的变化是很重要的。

731

直径为 20Å,长度为直径许多倍的 DNA 分子并不是理想的刚体。实际上,这些分子具有一定的柔性以使它能被包裹在细胞中。DNA 螺旋曲度范围很广,可平缓弯曲也可极度卷曲。正如我们即将看到的,偏离线形结构的极度卷曲往往是为了与特定蛋白的结合。

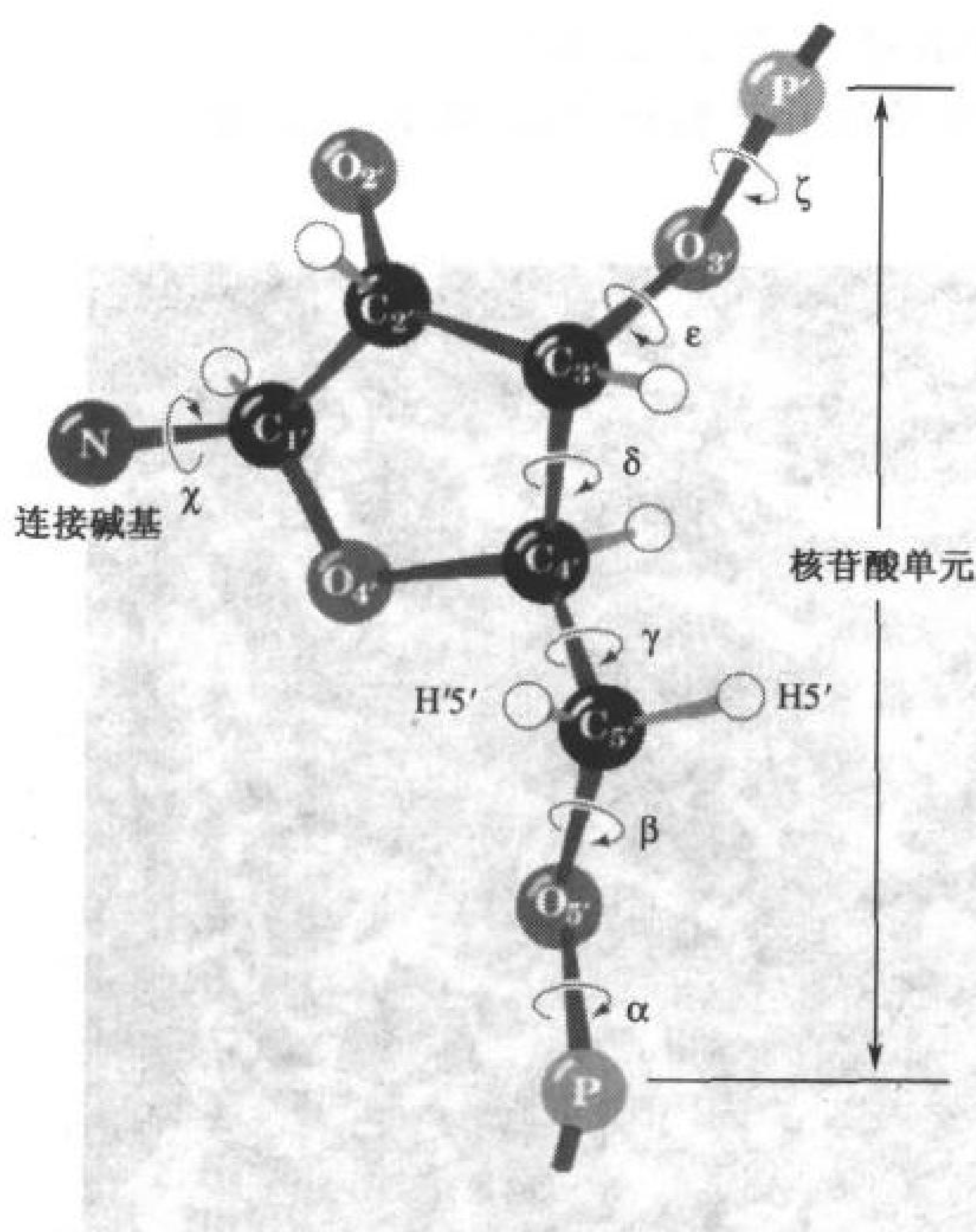


图 23-4 决定核苷酸单元构象的 7 个扭转角

DNA 构象的柔性是有限的

如图 23-4 所示,糖-磷酸骨架中 6 个扭转角和描述碱基与糖苷键(连接 C1′与碱基的键)方位的扭转角决定了核苷酸单元的构象。似乎每个核苷酸具有的 7 个自由度将使聚核苷酸高度柔性,然而多种内部约束极大地制约了这些扭转角的旋转自由度。

碱基绕糖苷键(扭转角 χ)的旋转是受极大限制的。嘌呤残基有 2 种空间取向:**顺**(syn;希腊语,with),**反**(anti;希腊语,against)构象(图 23-5)。嘧啶仅有反式是稳定的,因嘧啶 C2 取代基与糖环的空间位阻使得其顺式构象不稳定。*在大多数双螺旋核酸中,所有的碱基都处于反式构象*。只有 Z-DNA 是例外(节 23-1A),其中嘧啶残基是反式的,而嘌呤残基则是顺式的,这也是将 Z-DNA 重复单元看作二核苷酸的原因之一。

核糖环自身的柔性也是受限制的。正常五边形的顶角是 108°,该角度非常接近四面体角(109.5°),故可认为呋喃核糖环应该是接近平面的。然而,当环为平面时,环上的取代基将互相重叠。核糖环起褶即核糖环变成为非平面以减少甚至是氢原子之间的拥挤。在大多数已知的核苷和核苷酸晶体结构中,环上的 4 个原子在几百个埃的范围内是共平面的,余下的一个原子处于环外几十个埃的距离。处于环外的原子常常是 C2′ 或 C3′(图 23-6)。常见的核糖构象即为 **C3′-内**和 **C2′-内**:“endo”(希腊语:endin,在……内部)表示取代原子与 C5′位于环的同侧,与 C5′处于异侧则称之为**外**,**exo**(希腊语:exo,在……外部)。

732

核酸中的核糖皱褶在构象上是十分重要的,它决定了每个核糖残基上磷酸取代基的相对取

向。事实上，B-DNA 为 C2′-内构象，而 A-DNA 为 C3′-内构象。在 Z-DNA 中，嘌呤核苷酸为 C3′-内构象，嘧啶核苷酸为 C2′-内构象。

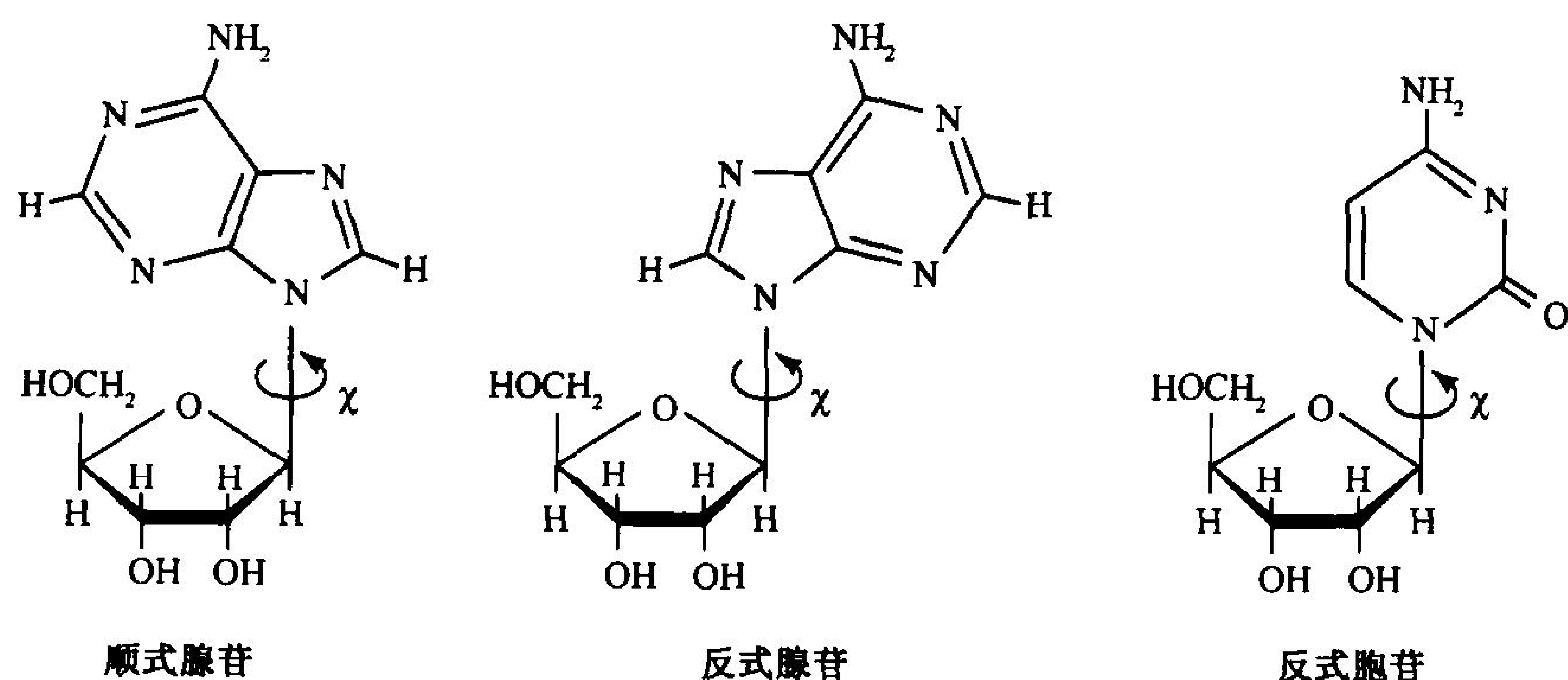


图 23-5 与核糖结合时嘌呤碱基和嘧啶碱基的空间允许取向
在 B-DNA 中，所有的核苷酸残基均为反式构象。

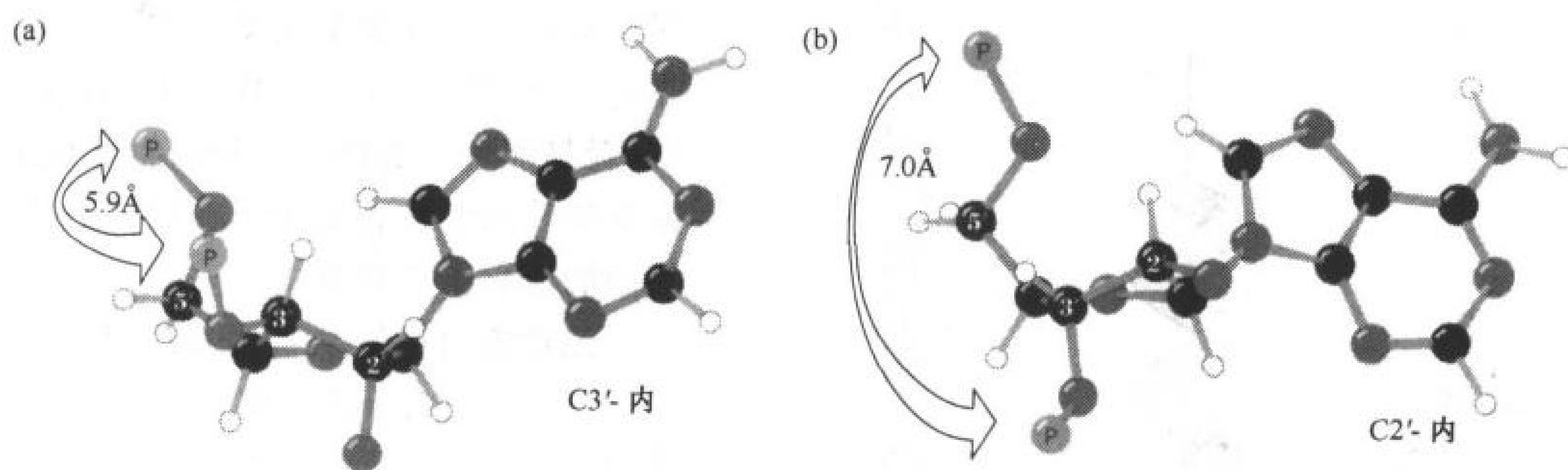


图 23-6 核苷酸核糖构象
(a) A-RNA 中 C3′-内构象(C3′位于 C5′同侧)。(b) B-DNA 中 C2′-内构象。图中标出了糖-磷酸骨架中相邻磷原子间的距离。[引自 Saenger, W., Principles of Nucleic Acid Structure, p. 237, Springer-Verlag(1983)]

糖-磷酸骨架受构象的约束

最后，如果糖-磷酸链上的扭转角(图 23-4 中的扭转角 $\alpha\sim\xi$)完全可以自由旋转，那么就不可能有稳定的核酸结构。然而，这些扭转角实际上是受限制的，这是因为核糖环与磷酸基团之间存在着非共价相互作用和聚核苷酸残基之间的空间位阻作用。总的效果是，*尽管糖-磷酸链构象角是有一定的松弛，但双螺旋中糖-磷酸链仍具刚性结构。*

C. 超螺旋 DNA

许多病毒和细菌中的染色体是双链 DNA 环状分子。通过电子显微镜观察(如图 23-7)，有些分子呈现特殊的扭曲形状，该现象称之为**超卷曲**(supercoiling)**或超螺旋**(superhelicity)。具有相同的核苷酸数目的超螺旋 DNA 分子远比“松弛”分子排列紧密，这对细胞中 DNA 分子折叠以及 DNA 片段的复制和转录时发生解旋具有重要作用。

733

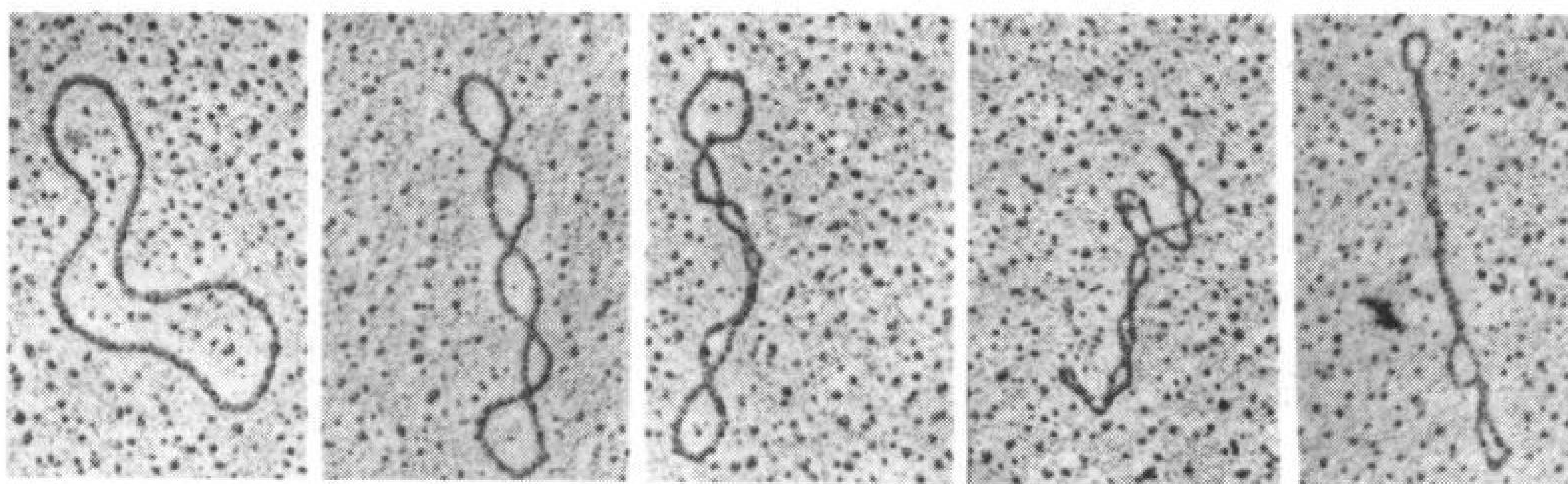


图 23-7 环状双链 DNA 的电子显微镜图像

构象由非超螺旋(左)变成紧密超螺旋(右)。[电子显微镜图由 Laurien Polder 提供。材料选自 Lornberg, A. Baker, T. A., *DNA Replication* (2nd ed.), p36, Freeman(1992)]

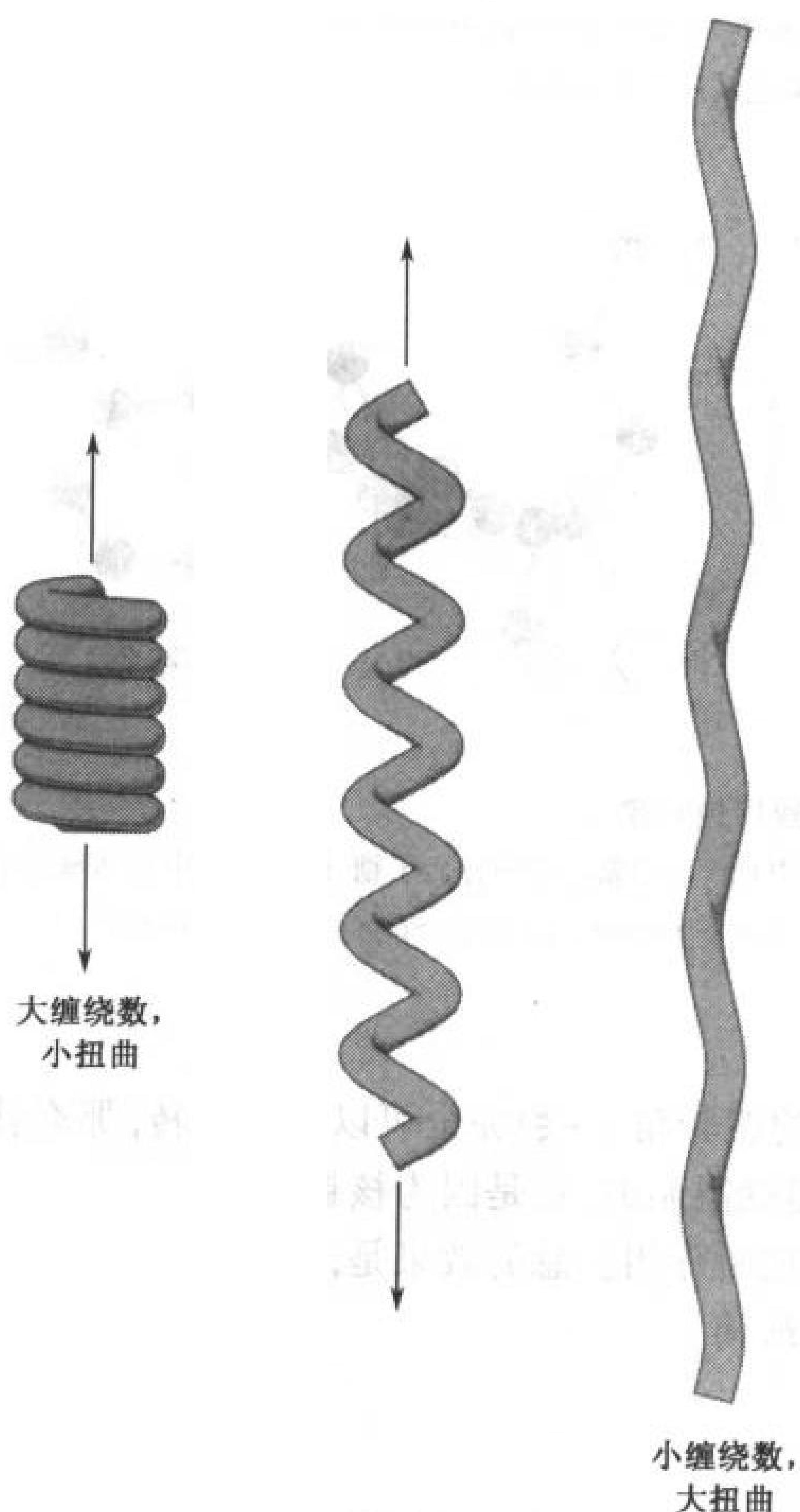


图 23-8 用扭曲的电话线来说明扭曲数与缠绕数之间的区别

在松弛状态(左),绳索处于大缠绕数、小扭曲数的状态。当拉伸线圈(中)直到接近直线时(右),它的缠绕数减小、扭曲数增大。

超螺旋拓扑学的简要表述

观察两条末端共价结合形成环状的双螺旋 DNA 分子。此结构具有以下几何特性:除非切割其中一条多核苷酸链,否则其螺旋的数目不会发生改变。你可以用一有扣的带子,带子的每边代表 DNA 的一条链,轻易演示上述特性。除非解开锁扣(切断多核苷酸链),否则带子在被扣上以前所扭曲的圈数不会被改变。

该现象可用数学表达为:

$$L = T + W \qquad [23\text{-}1]$$

式中:

1) ***L*,连接数**(linking number),指在 DNA 中一条链绕另一条链的圈数。将分子平放在平面上时可以很容易得到此整数,只要多核苷酸链仍保持共价完整,则连接数不会因分子扭曲和变形而发生改变。

2) ***T*,扭曲数**(螺旋数,twist),指一条链围绕双螺旋轴的完全圈数。按惯例,T 正为右手螺旋,因此,对于 B-DNA 分子,将碱基数除以 10.4(此数值为在水溶液中 B-DNA双螺旋每圈的碱基对表观数)即可得到 T。

3) ***W*,缠绕数**(writhing number),指螺旋轴绕超螺旋轴的次数。它是 DNA 超螺旋性质的量度。扭曲数与缠绕数之间的区别如图 23-8 所示,当一环状 DNA 分子

平放在平面上时，$W=0$。

图 23-9 中右侧的两幅 DNA 构象图是拓扑等价的；也就是说，它们有同样的连接数，L，但具有不同的扭曲数和缠绕数（拓扑学是研究在非切断条件下变形而不改变物体的几何性质的学科）。

既然 L 对于完整的双链 DNA 是一个常数，对每一个新的双螺旋扭曲数 ΔT 必然有一个数值相等符号相反的超螺旋缠绕数，即，$\Delta W=-\Delta T$。 例如，一个没有超螺旋的闭合 DNA 环（图 23-9，右上），通过将其双螺旋正向（右手）绕相同圈数能变形为负超螺旋构象（图 23-9，右下）。

734

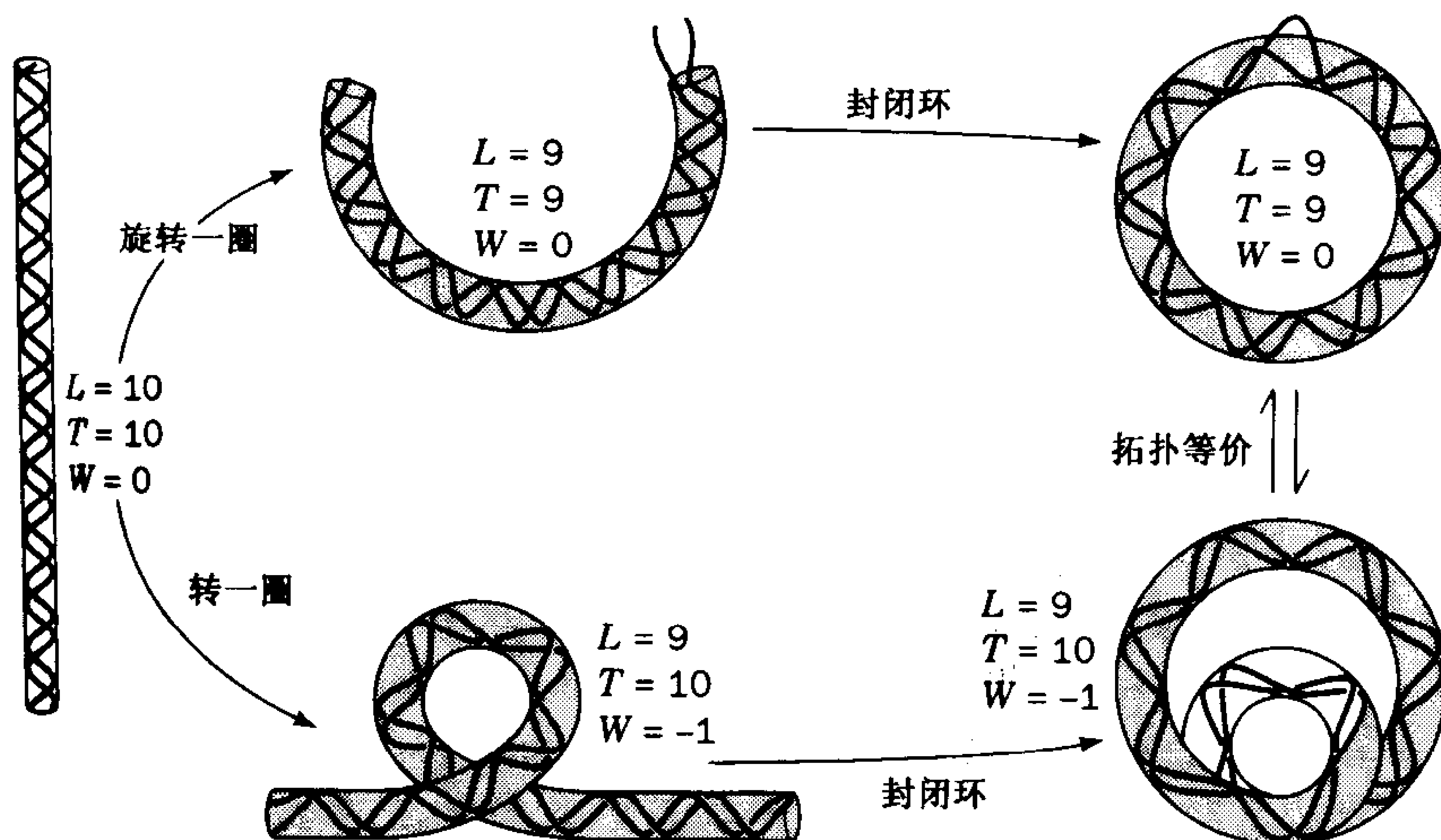


图 23-9　将超螺旋引入一个具有 10 圈螺旋的 DNA 分子的两条途径

所示两个闭合的环状结构（右）是拓扑等价的；也就是说，可以在不破坏任何共价键的情况下将其互相转换。图中均已标出了 L（连接数）、T（扭曲数）、W（缠绕数）。严格的说，连接数仅对共价闭合环而言。

切开一条链可松弛 DNA 超螺旋

胰脱氧核糖核酸酶 I（pancreatic DNase I），它是一种能切断聚核苷酸链中磷酸二酯键的内切核酸酶（endonuclease），这种酶仅切割双链 DNA 中的一条链，用它可以将超螺旋 DNA 转变为松弛环（如图 23-7 最左侧所示）。*一条链的切割足以松弛超螺旋 DNA*，这是因为对应于切割位置的糖-磷酸链可绕其骨架键自由旋转，从而减少分子的连接数（图 23-4），改变分子的超螺旋性，超螺旋在 DNA 环中构造了一个犹如橡皮筋的弹性环，这也是为什么松弛状态的 DNA 环并不构成超螺旋的原因。

天然生成的 DNA 环处于缠绕状态

天然 DNA 环的连接数比对应的松弛环的连接数少；即它们处于缠绕状态。然而，因为 DNA 总倾向于采用保持其每个螺旋 10.4 个碱基的总体构象，所以分子总是负超螺旋的（$W<0$，图 23-10，左）。如果双螺旋解旋（如果 T 减小），则 W 增加（L 必须保持常数）。首先，这减少了一个处于缠绕状态的环的超螺旋性。然而随着继续解旋，W 的数值经过 0（一个松弛的环，图 23-10，中）以后变为正值将产生一个正超螺旋（图 23-10，右）。

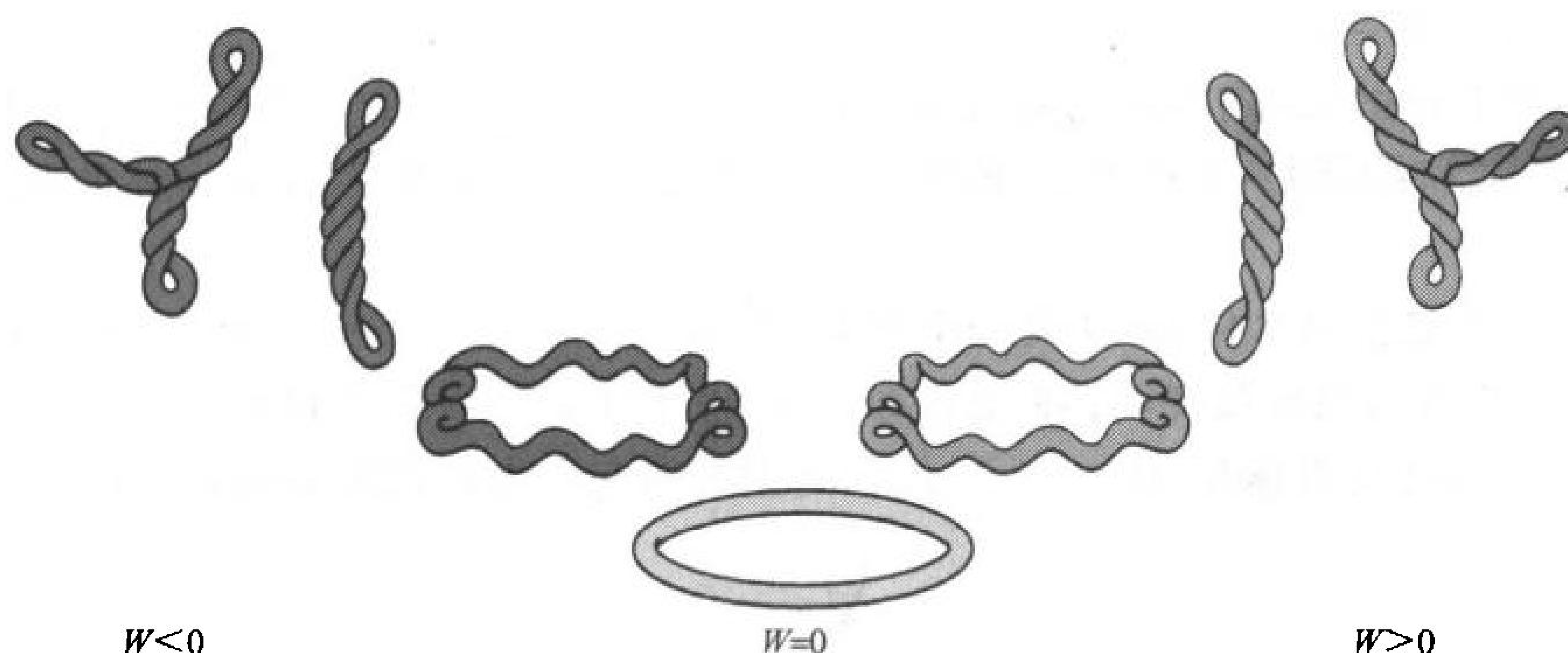


图 23-10 负超螺旋 DNA 分子的解旋过程

当负超螺旋环($W<0$)解旋时(不破坏共价键), $W=0$,进一步的解旋迫使 DNA 向反方向超螺旋,产生一个正超螺旋($W>0$)。

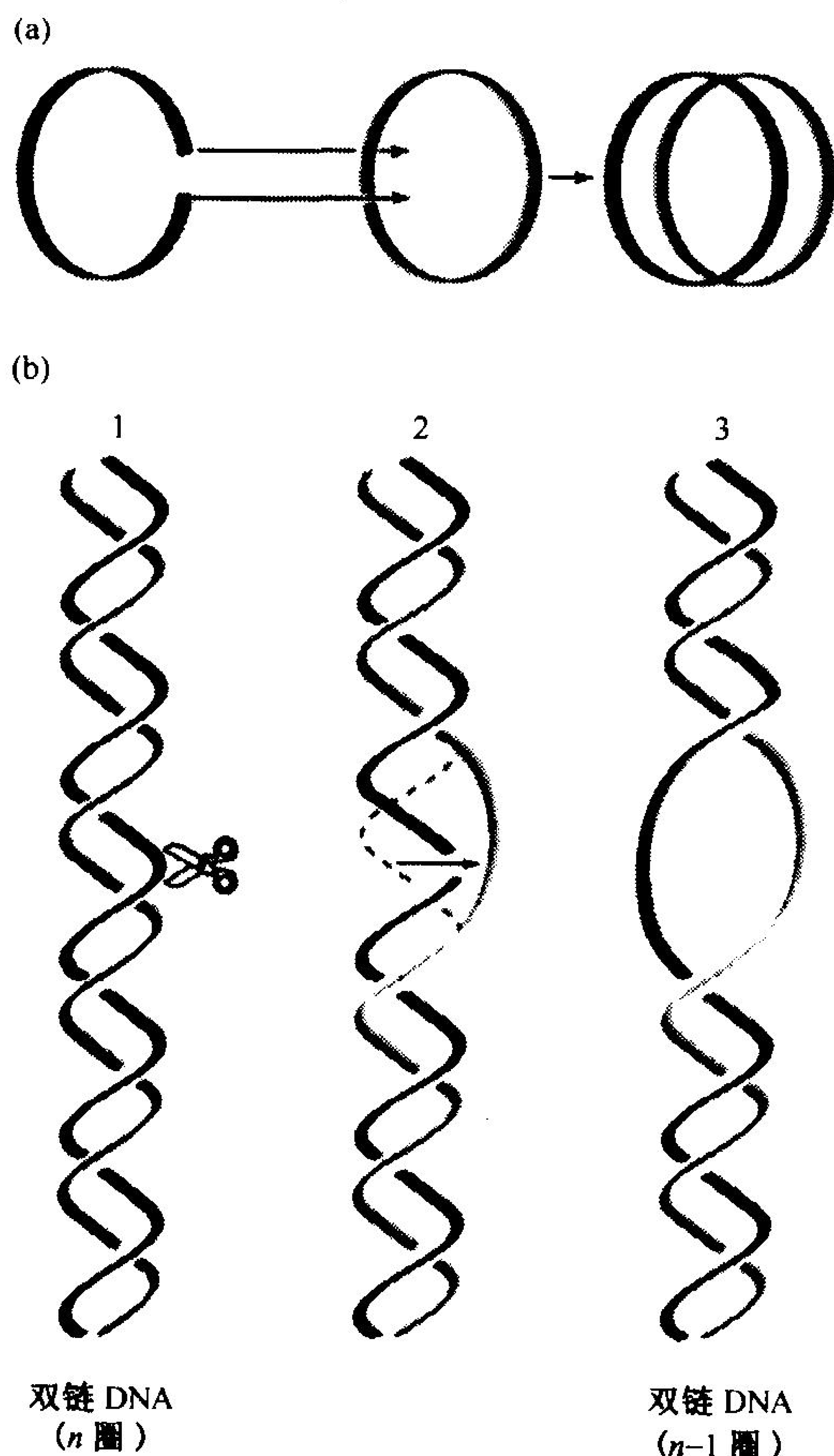


图 23-11 拓扑异构酶 I 的作用

通过切断一条单链,待另一条链穿过生成的缺口后重新封合缺口,拓扑异构酶 I 能 (a)连接两条单链环或 (b)使双链 DNA 螺旋解旋一圈。

拓扑异构酶调控 DNA 超螺旋

只有当 DNA 处于合适拓扑状态时,DNA 才能行使正常功能。在诸如复制和翻译等基本生物过程中,互补的多核苷酸链分开。原核生物和真核生物体内天然 DNA 的负超螺旋,因其倾向于解开双螺旋(W 的增加必定伴随 T 的减少)而促进上述多核苷酸链的分离。如果 DNA 缺乏合适的超螺旋,将不能发生上述生命过程。

DNA 超螺旋由称之为**拓扑异构酶**(topoisomerase)的一组特殊酶所控制,之所以这样命名是因为这些酶改变环状 DNA 的拓扑状态(拓扑缠绕数)而不是它的共价结构。在原核生物和真核生物中有两类这样的拓扑异构酶:

1)**拓扑异构酶 I** 的作用是在 DNA 中产生瞬时单链断裂;

2)**拓扑异构酶 II** 的作用是在 DNA 中产生瞬时双链断裂。

拓扑异构酶 I 逐渐松弛超螺旋 DNA

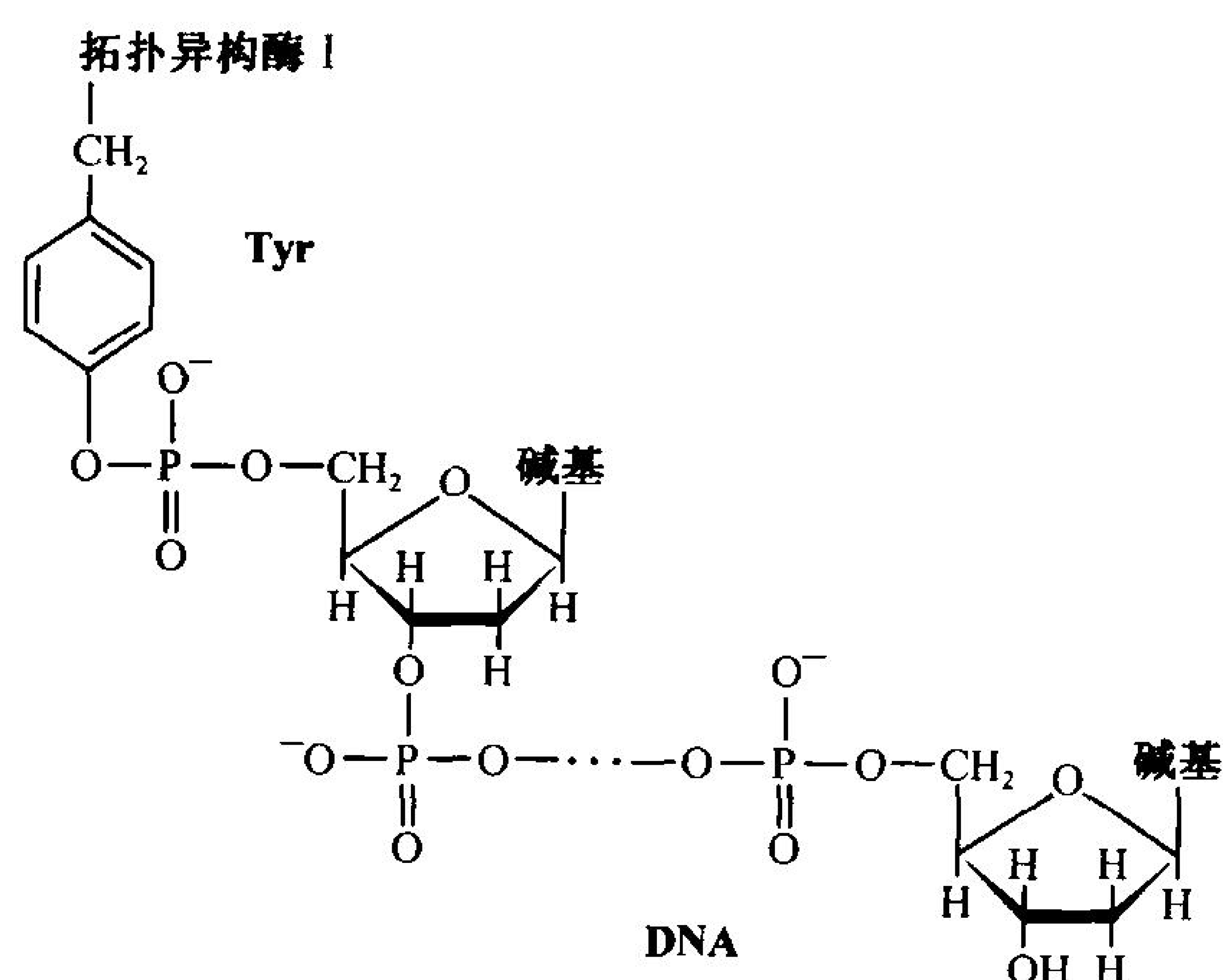
拓扑异构酶 I 也被认为是**切口闭合酶**(nicking-closing enzyme)。原核生物拓扑异构酶每次通过连接数增加 1 来催化 DNA 中的负超螺旋的松弛。由于酶的持续作用,暴露于切口闭合酶下

的负超螺旋 DNA 持续增加其连接数，直到超螺旋完全松弛为止。真核生物拓扑异构酶 I 既可以松弛正超螺旋 DNA，也可以松弛负超螺旋 DNA。

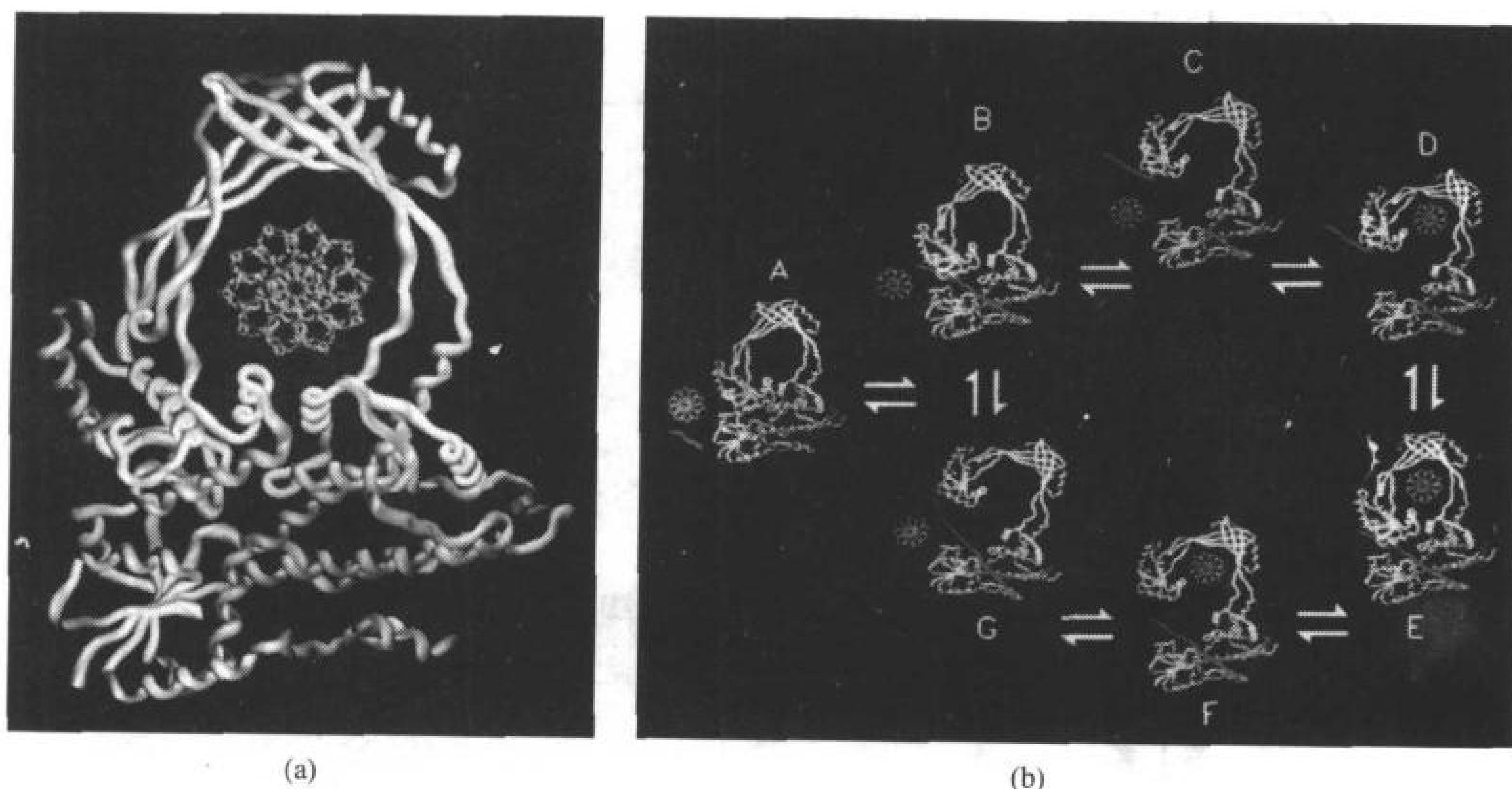
该酶可逆**互连**(catenate)单链环的研究为解释酶的作用机理提供了线索(图 23-11(a))。很显然，酶切断一条单链，待另一条单链穿过生成的缺口后重新封合缺口(图 23-11(b))，因此使双链 DNA 扭曲一圈。

736

67kDa 的 *E. coli* 拓扑异构酶 I 的 N 端片段的 X 射线衍射结构表明，该蛋白包含一个容纳单链或双链 DNA 的直径为 27.5Å 的孔(图 23-12a)。孔内表面顺序排列带正电荷的残基(18 个 Arg 和 Lys 残基，但仅有 9 个 Asp 和 Glu 残基)，这正是理想的 DNA 结合表面。受束缚的 DNA 分子穿过一条单链 DNA 上的缺口(图 23-12b)，在催化过程中，活性中心位置的 Tyr 残基与断裂 DNA 链的一端形成酪氨酰磷酸二酯键，在切口重新封合时此过程是可逆的。一些拓扑异构酶形成 5′-磷酸酪氨酸中间体(如上所示)；其他一些形成 3′-磷酸酪氨酸中间体。两种类型的共价酶-DNA 加合物均可保存切断磷酸二酯键所释放的自由能，以致在缝合 DNA 缺口时不需要再补充自由能。



737



(a) (b)

图 23-12 *E. coli* DNA 拓扑异构酶 I

(a) 67kDa 的拓扑异构酶 I 的 N 端片段的 X 射线衍射结构。沿双螺旋轴向观察，蛋白缠绕形成的孔足以容纳 B-DNA。(b) 拓扑异构酶的可能机理：蛋白(A)在有催化活性的酪氨酸残基(红点，B)附近结合一单链 DNA(绿色)，单链 DNA 被切割(C)，蛋白展开以允许双链 DNA(或是单链 DNA)穿过缺口(D)，随即单链 DNA 的两个片段重新结合(E)，蛋白再次展开(F)以释放双链 DNA(G)。复合物恢复状态 B，开始又一次的链穿越反应或是分解恢复至大分子组件(A)。虽然该模型表示双链 DNA 穿越暂时被切割的单链，但对单链 DNA 同样也适用。

(引自西北大学的 Alfonso Mondragon)

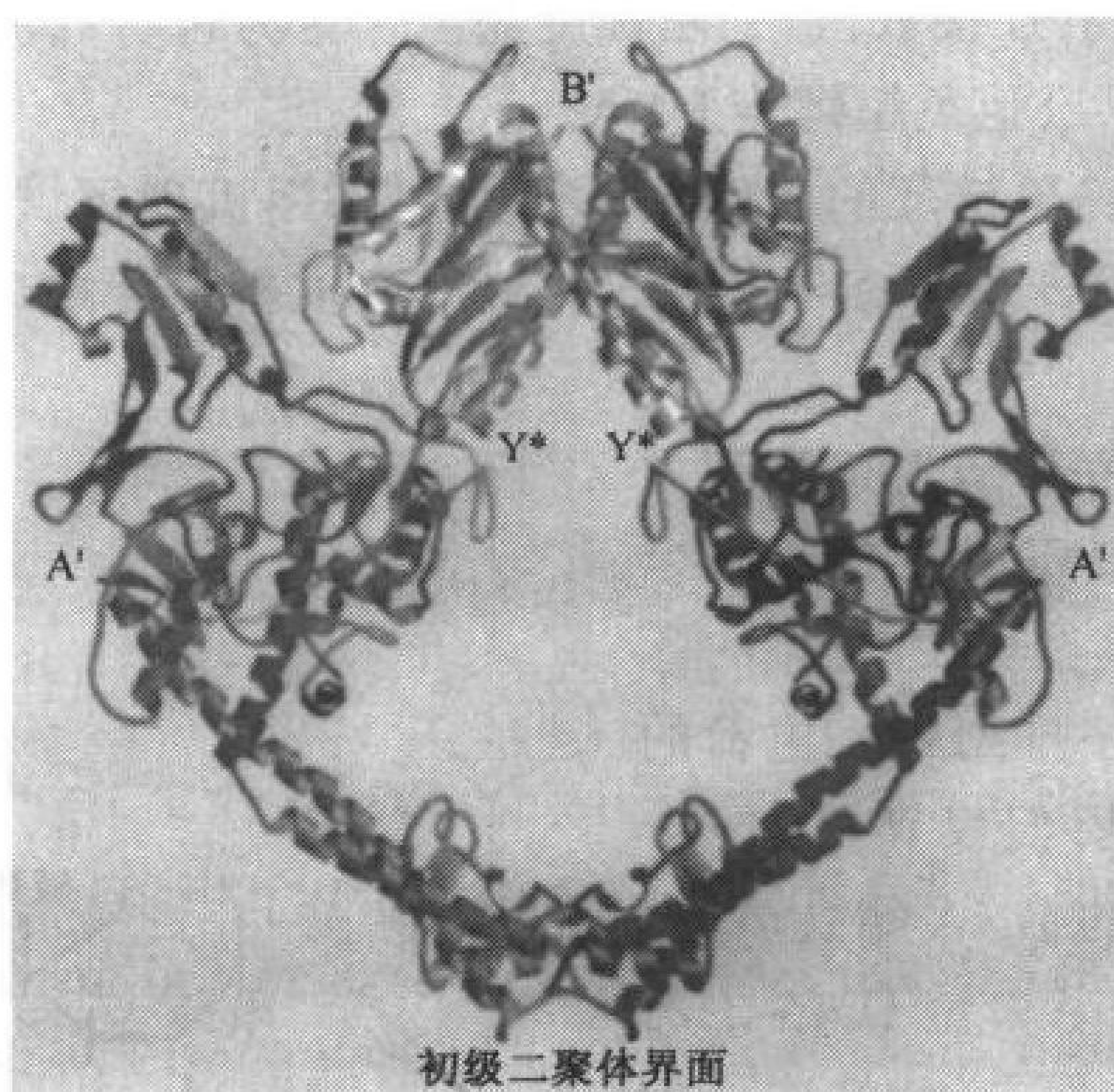


图 23-13 酵母拓扑异构酶 II 的 X 射线衍射结构(1429 残基大小的亚基的 410～1202 残基)
同二聚体蛋白用飘带图表示,两个亚片段 A′分别用浅蓝和深蓝表示,亚片段 B′用红色和金色表示。活性中心 Tyr 残基用绿色球表示并用 Y* 标出。(引自哈佛大学的 James Berger, Stephen Harrison 和 James Wang)

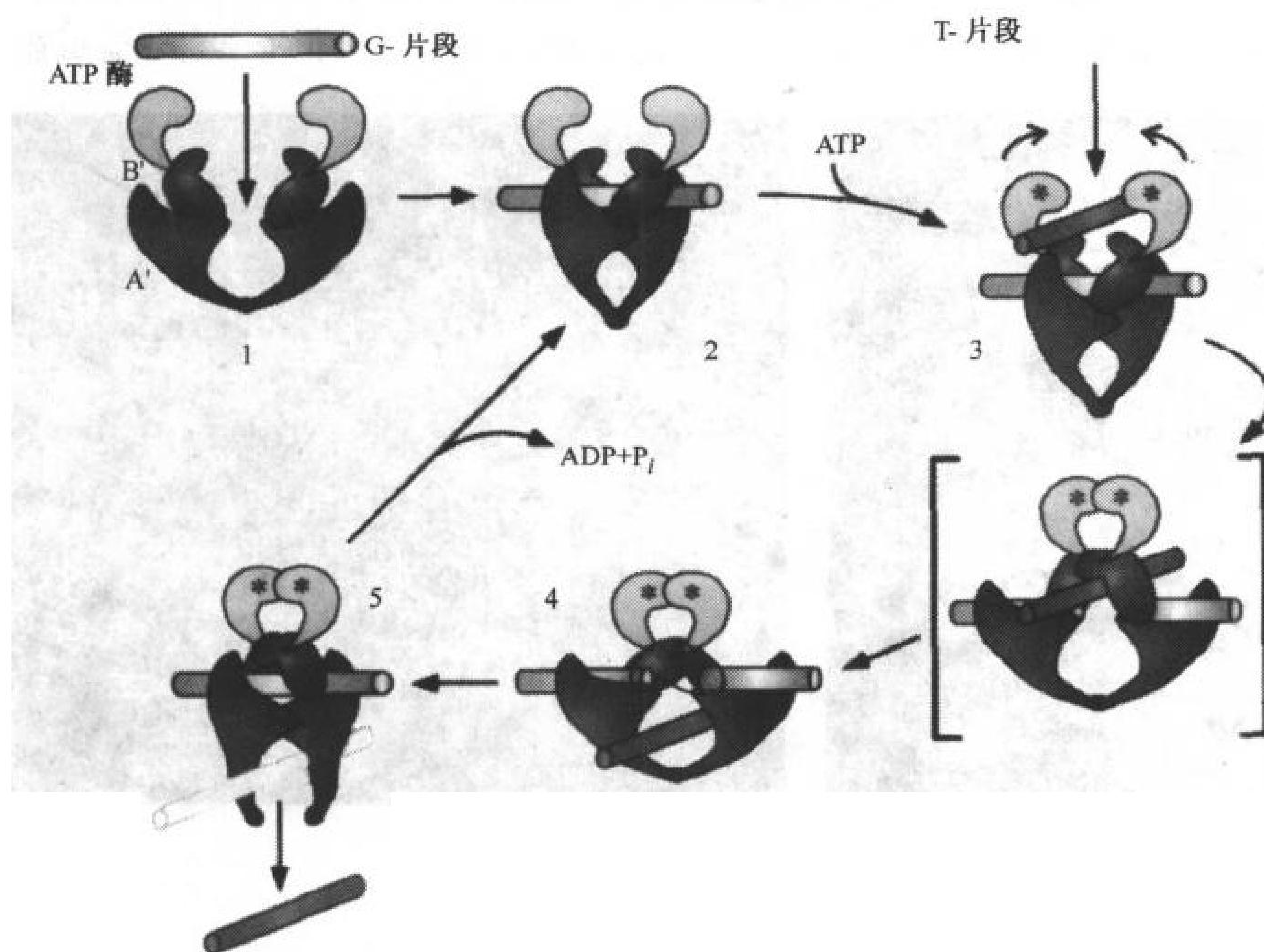


图 23-14 推测的拓扑异构酶 II 的作用机理

(1) 非配位酶(黄,红,蓝色亚片段)与双链 DNA(G 片段;灰色)结合,随后发生构象变化。(2)将 DNA 钳住到位。(3) 与 ATP 结合(用星号表示)促进 G 片段 DNA 的切割。(4)使另一双链 DNA(T 片段,绿色)能通过并进入酶的中心孔。(5) G 片段缝合,T 片段与酶分离。ATP 水解并释放以重新回到起始状态(2)。(引自哈佛大学的 Stephen Harrison 和 James Wang)

拓扑异构酶 II 水解 ATP

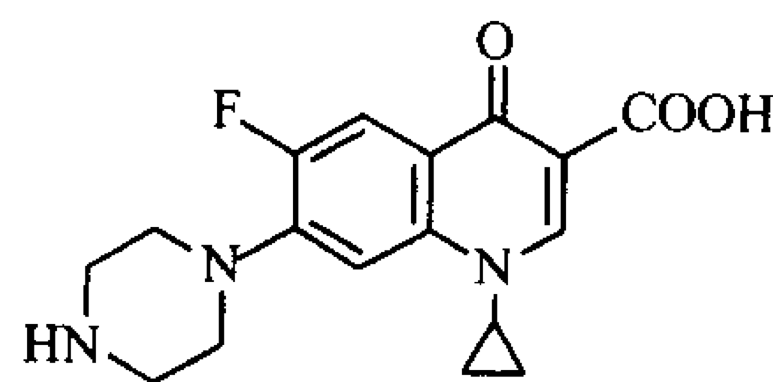
拓扑异构酶 II 是一个多聚酶，需要 ATP 水解以完成以下反应循环：切割两条 DNA 链，双链 DNA 穿过缺口，缺口重新缝合。原核生物和真核生物拓扑异构酶 II 均能松弛正负超螺旋，但只有原核生物的酶[也被称为 **DNA 旋转酶**(DNA gyrase)]可以引入负超螺旋。真核生物染色体中的负超螺旋在核小体的包裹中先形成，而不是由于拓扑异构酶的作用而产生的。

框 23-1 健康和疾病的生物化学

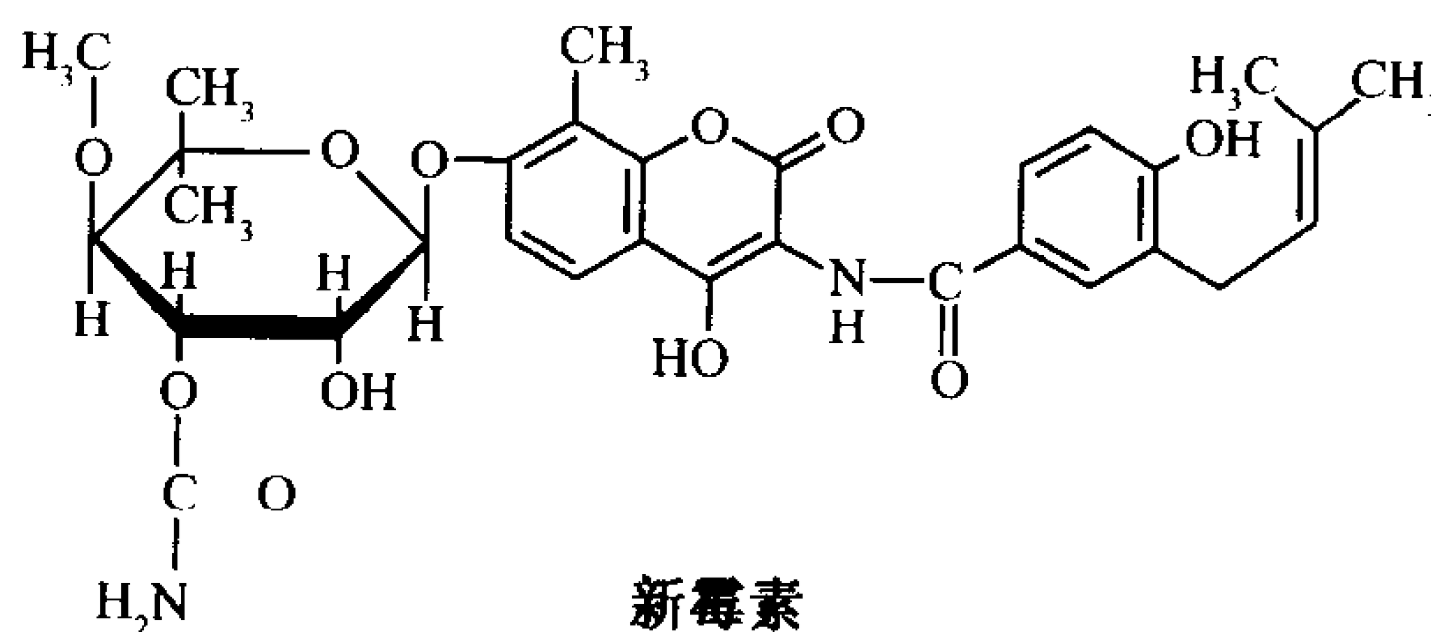
拓扑异构酶 II 的抑制剂：抗生素和化疗试剂

拓扑异构酶 II 能被多种化合物抑制。例如，ciprofloxacin 和新霉素能特异抑制 DNA 旋转酶，但不作用于真核生物拓扑异构酶 II，因此可作为抗生素。实际上，ciprofloxacin 是目前临床最有效的口服抗生素，新霉素的副作用及其细菌迅速产生的抗药性导致其不再用于治疗人类传染病。包括阿霉素和依托泊苷的许多物质抑制真核生物拓扑异构酶 II，因此广泛应用于癌症化疗上。

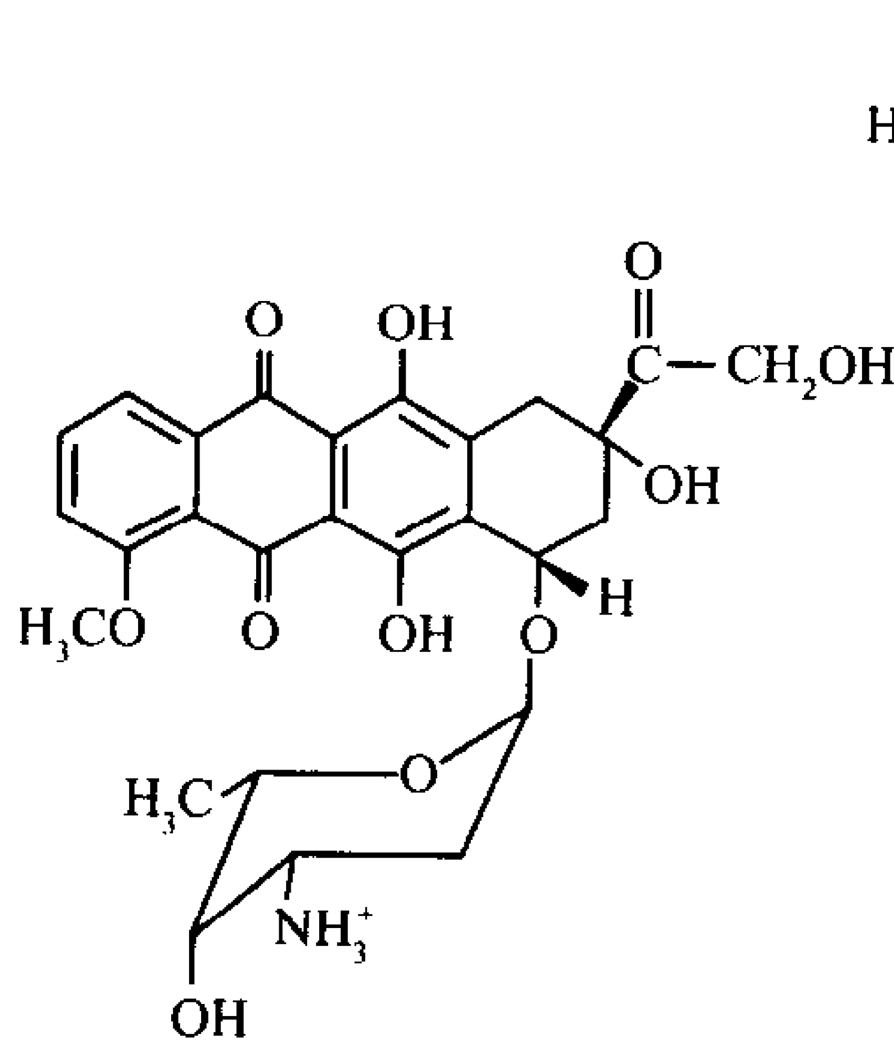
不同类型拓扑异构酶 II 的抑制剂通过两条途径之一起作用。包括新霉素在内的许多试剂，抑制它们的靶酶的 ATP 酶活性，它们通过阻断拓扑异构酶的活性，其结果是抑制 DNA 复制和 RNA 转录，以杀死细胞。然而包括 ciprofolxacin、新霉素和依托泊苷等其他一些物质则是增强其目标拓扑异构酶 II 切割双链 DNA 的速率和(或)减弱缺口缝合的速率，这些物质导致治疗的细胞 DNA 中产生高于正常水平的瞬时桥联蛋白缺口。蛋白桥很容易被复制和转录机制破坏，因此成为永久性的缺口。虽然所有细胞都有许多酶机制用以修复被破坏的 DNA(节 24-5)，但足够高水平的 DNA 损伤仍能导致细胞死亡。所以，既然诸如癌细胞的快速繁殖细胞能提高拓扑异构酶 II 的水平，通过抑制拓扑异构酶 II，癌细胞比慢繁殖或静止细胞更容易招致致命的 DNA 损伤。



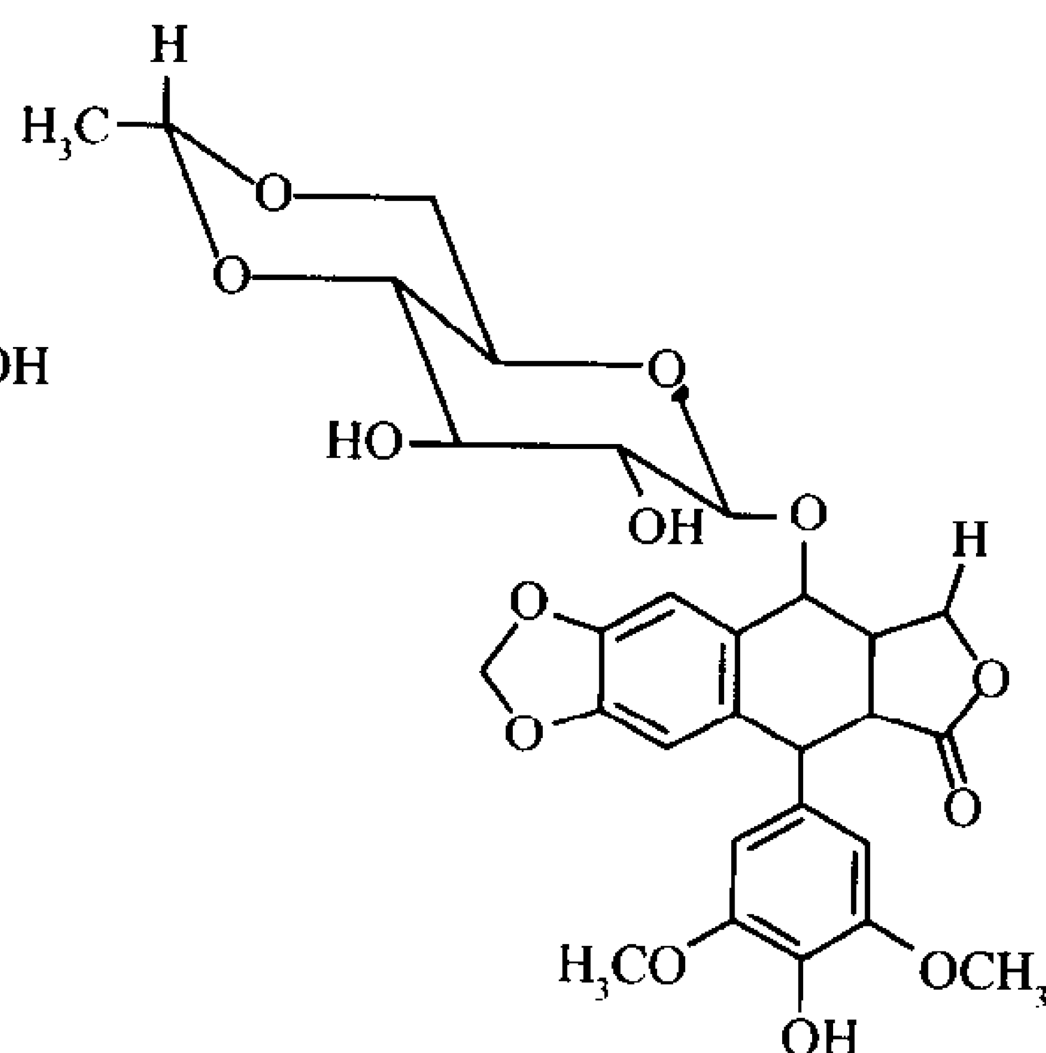
Ciprofloxacin



新霉素



阿霉素



依托泊苷

拓扑异构酶 II 表面上类似于拓扑异构酶 I:它们均有一对起催化作用的 Tyr 残基,该残基与 DNA 双链的 5′端形成瞬时的共价中间体,因此它们参与两条 DNA 链在交错位置的切割,以形成四碱基的“黏性末端”。Stephen Harrison 和 James Wang 得到酵母拓扑异构酶 II 的一个同二聚体大片段的 X 射线衍射结构,指出该酶因缺乏完整的蛋白的 ATP 酶结构域而只能切割双链 DNA,不能使其穿越缺口。像心脏一样的二聚物有一个底为 55Å、高为 60Å 的三角形孔(图 23-13),此孔远大于 B-DNA 的直径。

根据 X 射线衍射结构,用图 23-14 可表示拓扑异构酶 II 的催化机理。待切割的 DNA 先结合在酶上并被钳住到位,在 ATP 存在下,结合的 DNA 被切割,第二条双链 DNA 穿过开口进入蛋白的中心孔,被切割的 DNA 重新缝合,被运送的 DNA 从与其进入点相对的另一边离开复合物,ATP 水解成 ADP + P_i,为酶的下一次催化循环作准备。

许多抗生素和化疗试剂是拓扑异构酶的抑制剂,这一事实证明拓扑异构酶在维持 DNA 合适的拓扑状态中的重要性(见框 23-1)。

739

2.稳定核酸结构的力

DNA 只有有限的二级结构,没有可比较的三级、四级结构,DNA 没有呈现类似蛋白质结构的复杂性。从构成蛋白质的 20 种氨基酸拥有远比 4 种 DNA 碱基多的化学和物理性质也可预计到这一点。虽然如此,许多 RNA 仍有明确的三级结构。在本节中,我们将讨论稳定核酸结构的力。

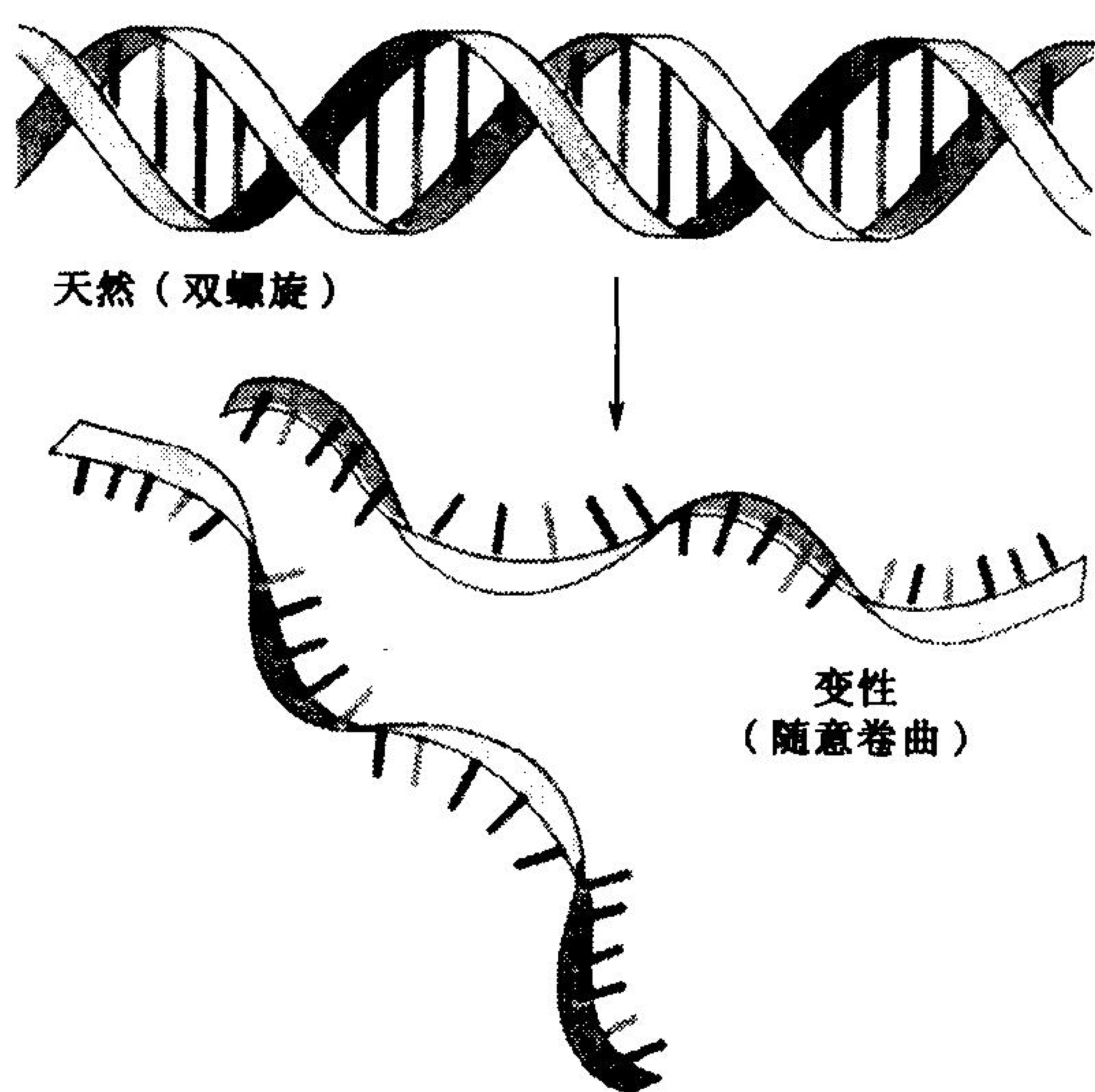


图 23-15 DNA 变性的图解

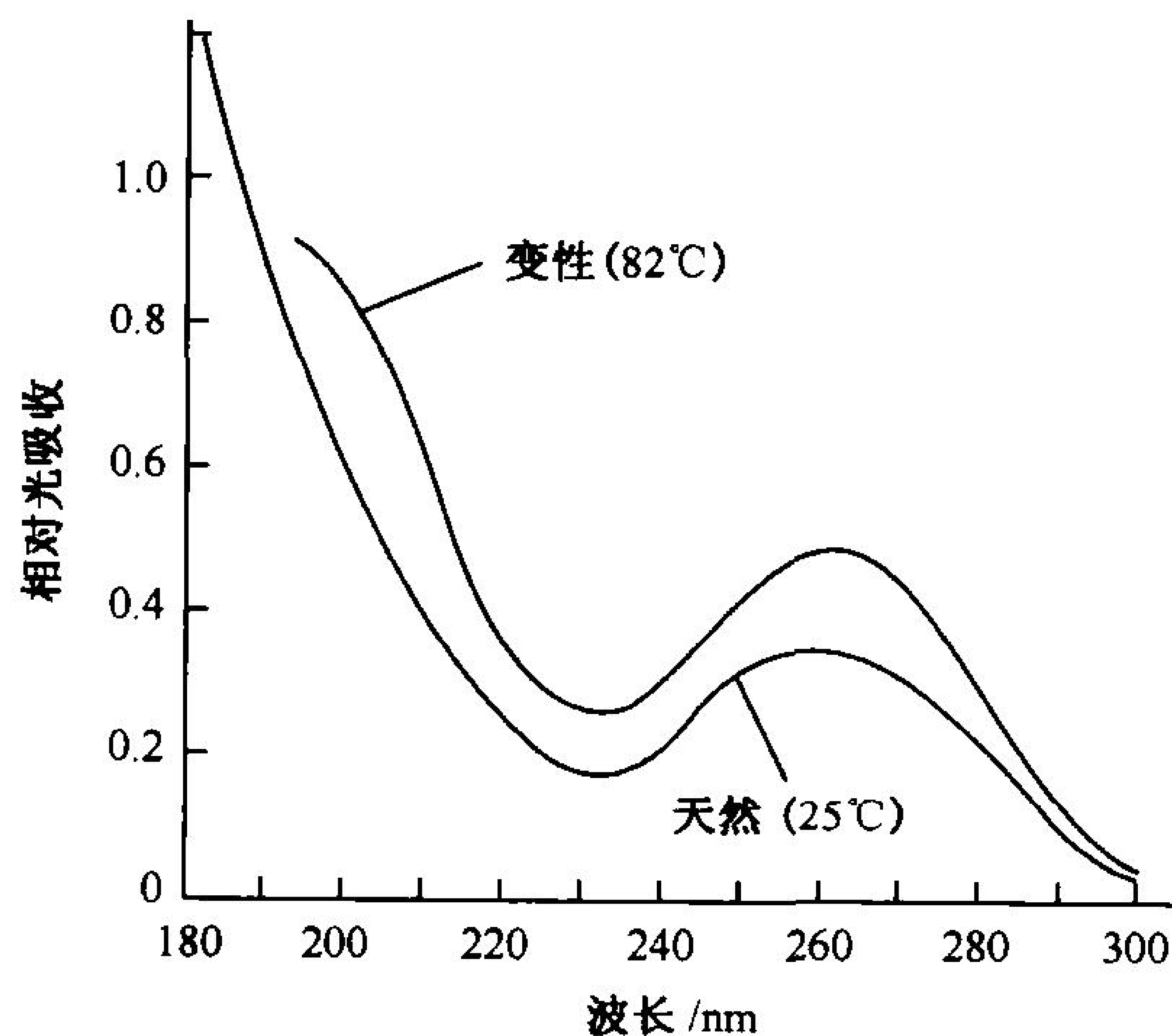


图 23-16 天然和加热变性的 *E.coli* 的 DNA 的紫外吸收光谱

注意变性并不改变吸收曲线的形状,而只增加其吸收的强度。

[引自 Voet, D., Gratzer, W.B., Cox, R.A., 和 Doty, P., Biopolymers 1, 205, (1963)]

A. 变性和复性

当双链 DNA 溶液被加热至特征温度时，其天然结构崩溃，互补双链解开并形成随机构象(图 23-15)。该变性过程伴随着 DNA 物理性质的改变，例如，当 DNA 解体形成柔性单链构象时，天然 DNA 溶液特征的高黏度(来自 DNA 刚性和棒状双链分子结构抗变形能力)突然减小了。同样随着相邻碱基间电子相互作用的消失，来自芳香碱基的 DNA 紫外吸收在变性时也增加了约 40%(图 23-16)。

观察单波长(通常 260nm)吸光度的变化，可以显示随着温度增加吸光度在一个非常窄的范围内增加(图 23-17)。这表明 DNA 的变性是一个协同现象，结构的一部分崩溃影响其余结构的崩溃。这与固体融化类似，图 23-17 被称为熔解曲线(melting curve)，温度曲线的中点被定义为熔解温度(melting temperature, T_m)。 740

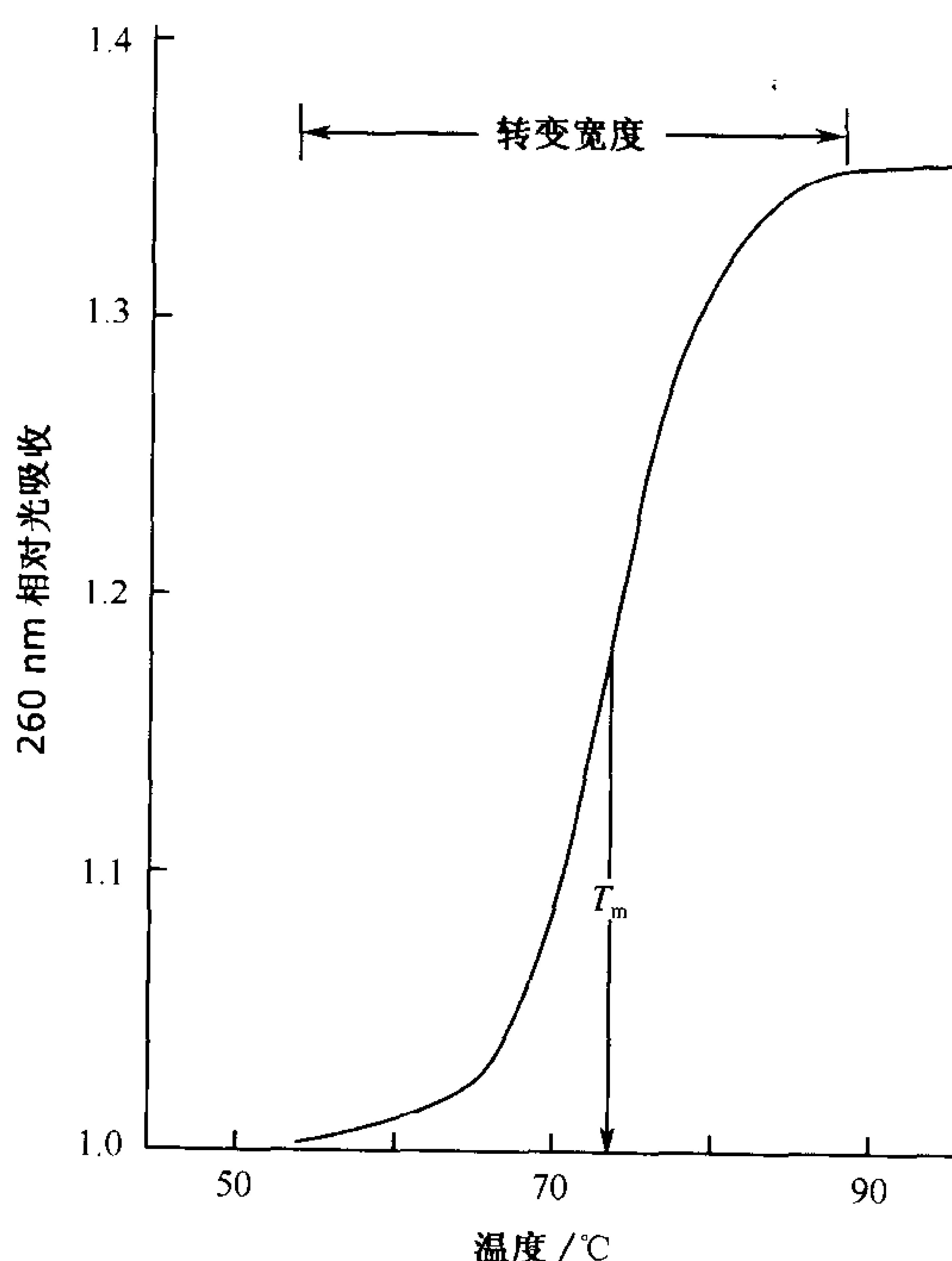


图 23-17 DNA 熔解曲线的一个例子

相对吸收是指在 260 nm 处的吸收值(取在 25℃ 时为 1)，熔解温度 T_m 是获得最大吸收一半时的温度。

DNA 双螺旋的稳定性及其 T_m 取决于多种因素，包括溶剂性质、溶液中离子类型和浓度以及 pH 值。随 G·C 碱基对摩尔分数的增加，T_m 线性升高，虽然这并不全是因为 G·C 碱基对比 A·T碱基对多一根氢键的原因(见下)。

变性 DNA 的复性

如果变性 DNA 溶液快速降温至 T_m 以下，生成的 DNA 只能部分碱基配对(图 23-18)，这是因为在随机碱基配对结构变得有效“冻结”之前，互补链没有足够的时间找到它的另一个。然而，如果在低于 T_m 约 25℃ 保持足够时间，可提供热能以使短碱基配对区域重新熔化并再次成形。

在 Julius Marmur 于 1960 年发现的**复性**(annealing)条件下,变性的 DNA 最后完全复性。同样在称之为**杂交**(hybridization)的过程中,互补的 RNA、DNA 链形成 RNA-DNA 杂交双链的稳定性仅稍弱于对应的 DNA 双链。

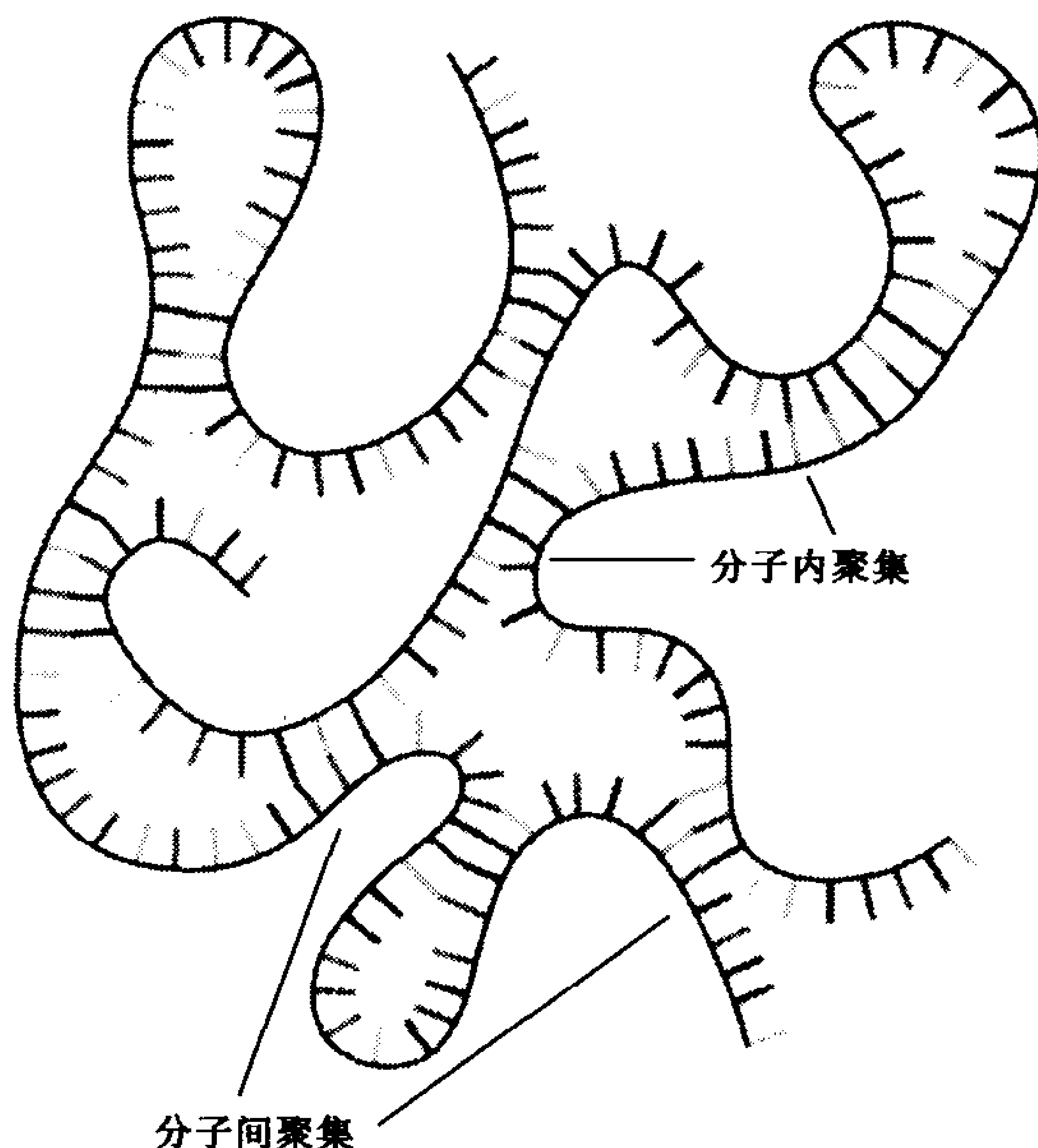


图 23-18 部分复性 DNA

该图显示被变性的 DNA 快速冷却后呈现的不完全碱基配对,注意在分子内和分子间也会出现聚集。

B. 碱基对

很显然碱基对是维持双链核酸的"黏合剂",Waston-Crick 碱基对仅出现在自身互补寡聚核苷酸的晶体结构中。然而,已知还存在其他合理的几何氢键碱基对(图 23-19)。例如,单体腺嘌呤和胸腺嘧啶衍生物共结晶,构成恒定不变的 A·T 碱基对上的腺嘌呤 N7(**Hoogsteen** 构型;图 23-19b)比 N1(Waston-Crick 构型;图 23-1)更易作为氢键受体。

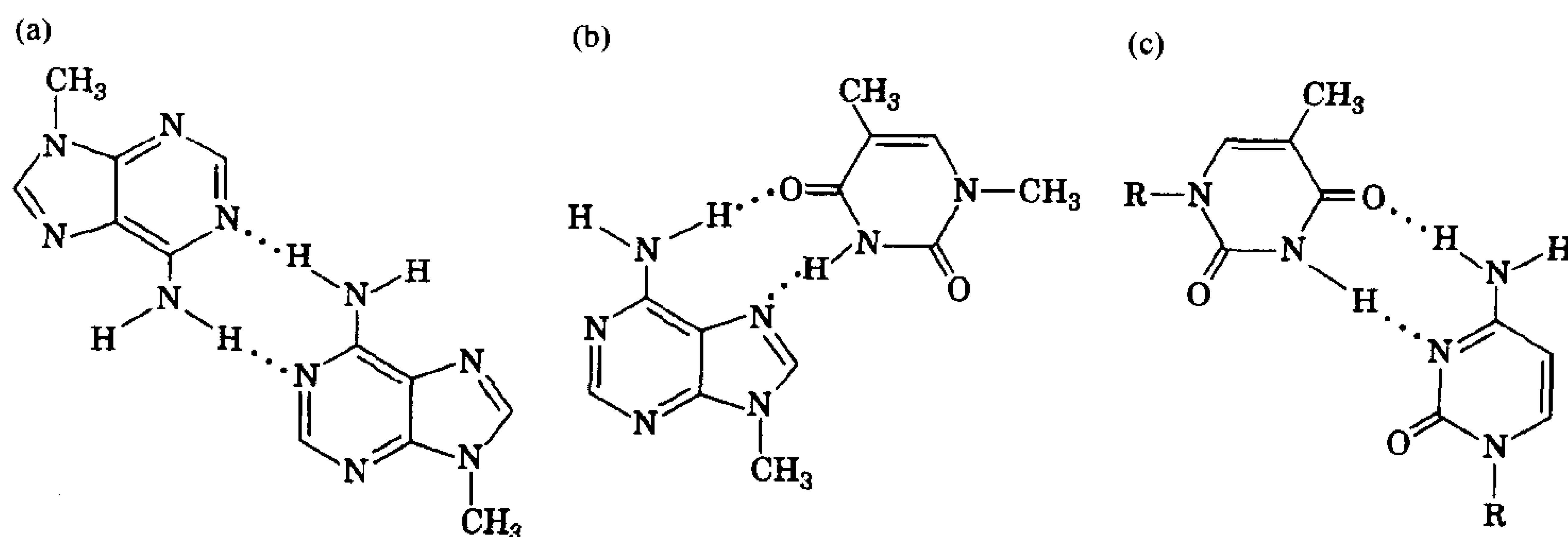


图 23-19 一些非 Waston-Crick 碱基对

(a) 9-甲基腺嘌呤晶体结构中的腺嘌呤对。(b) 9-甲基腺嘌呤·1-甲基胸腺嘧啶晶体结构中腺嘌呤和胸腺嘧啶残基的 Hoogsteen 对。(c) 胞嘧啶与胸腺嘧啶残基间的假像配对(R 代表核糖-5-磷酸)。(可将这些碱基对与图 23-1 进行比较)

这些及其他一些观测结构表明，尽管非 Waston-Crick 碱基对在理论上是可行的，但 Waston-Crick 构型仍是双螺旋中最稳定的碱基对模式。最初认为双螺旋的几何限制排斥其他类型的碱基对，回想因为 A·T、T·A、G·C、C·G 对是几何结构相似的，它们可以相互交换而不改变糖-磷酸骨架构象。然而，实验测量显示，其他碱基对不出现在双螺旋中的主要原因是 Waston-Crick 碱基对有固有的稳定性，而非 Waston-Crick 碱基对缺乏这种稳定性；即在 Waston-Crick 对中的碱基比非 Waston-Crick 对中的碱基有更高的相互亲和性。不过正如我们所看到的，为稳定它们的三级结构，许多 RNA 双螺旋片段中含有 G·U 这样的不寻常的碱基对。

氢键对核酸结构的稳定性贡献很小

很明显，氢键对 DNA 中的特定碱基配对是必需的。然而，正如在蛋白质中一样（节 6-4A），氢键对核酸结构的稳定性贡献很小。这是因为在变性过程中，天然核酸碱基对间的氢键被更强的碱基与水之间的等价氢键所代替，因此在稳定核酸结构方面必有其他类型的因素扮演着重要的角色。

C. 碱基堆积和疏水相互作用

在核酸结构（图 23-2c）和结晶的核酸碱基（图 23-20）中已经观察到，嘌呤和嘧啶倾向于形成平面平行分子的延续堆积，这些**堆积相互作用**（stacking interaction）是范德华相互作用的一种形式（节 2-1A）。G 和 C 碱基堆积之间的相互作用比 A 和 T 碱基堆积之间的相互作用来得强（表 23-2），用这可以解释具有高 G + C 含量的 DNA 有高的热稳定性。也应注意堆积中不同碱基对有不同的堆积能，因此，双螺旋的堆积能是与序列相关的。

表 23-2　B-DNA 中 10 种可能二聚体的堆积能

堆积二聚体	堆积能/($kJ\cdot mol^{-1}$)
C·G G·C	−61.0
C·G A·T	−44.0
C·G T·A	−41.0
G·C C·G	−40.5
G·C G·C	−34.6
G·C A·T	−28.4
T·A A·T	−27.5
G·C T·A	−27.5
A·T A·T	−22.5
A·T T·A	−16.0

引自 Ornstein, R. L., Rein, R., Breen, D. L., and MacElroy, R. D., Biopolymers 17, 2356(1978)。

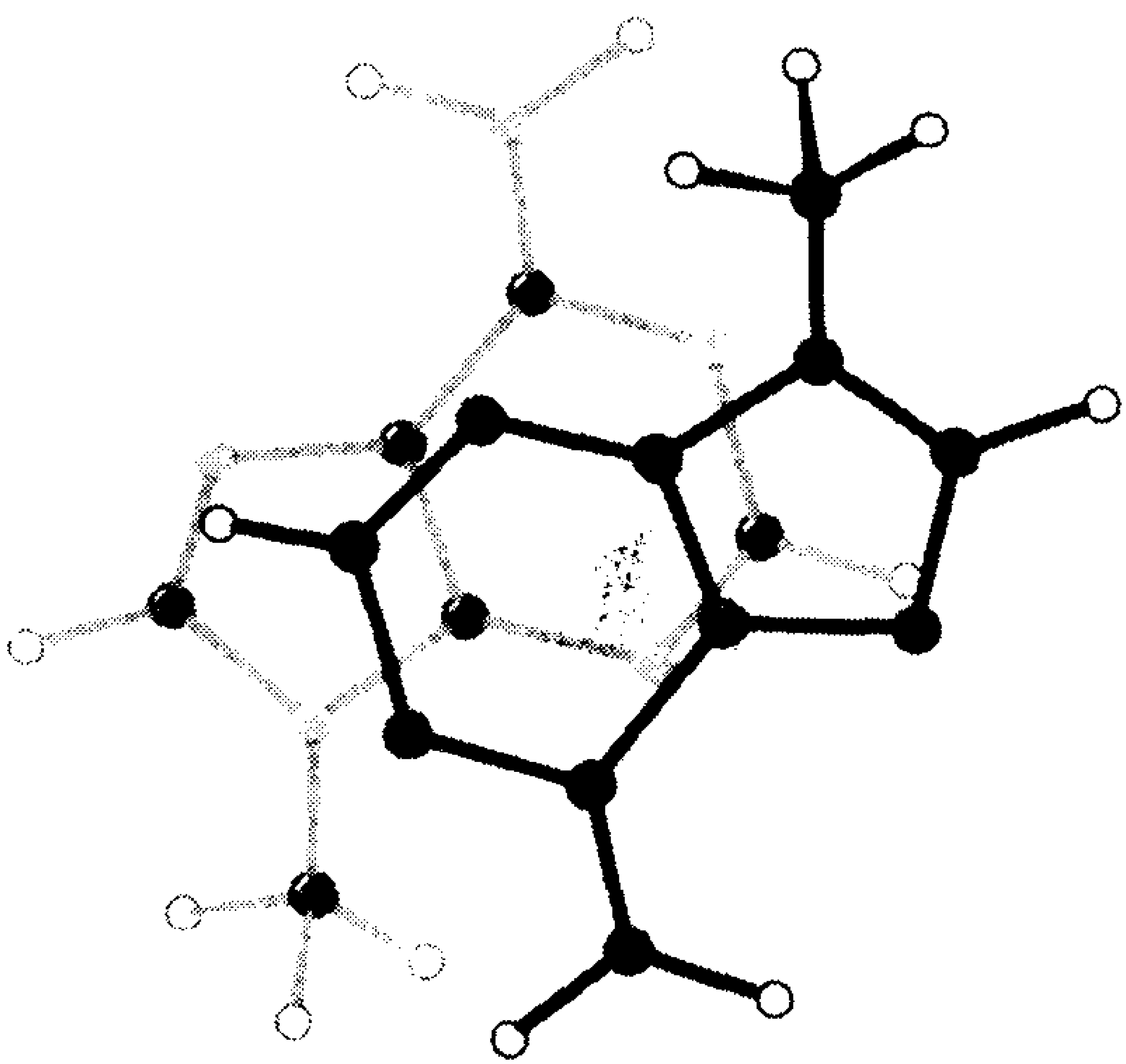


图 23-20　9-甲基腺嘌呤晶体结构中的腺嘌呤环的堆积　环的部分重叠是晶体结构和双螺旋核酸中的碱基之间的典型缔合作用。[引自 Stewart, R.F. and Jensen, L.H., J.Chem. Phys.40, 2071(1964)]

单链多核苷酸，如 poly(A)，由紫外吸收随温度升高而升高表明同样有堆积作用，例如，堆积碱基在高温时“融熔”离解导致吸收增加；图 23-21。从平缓的熔解曲线可证明该过程不是高度协同进行的。

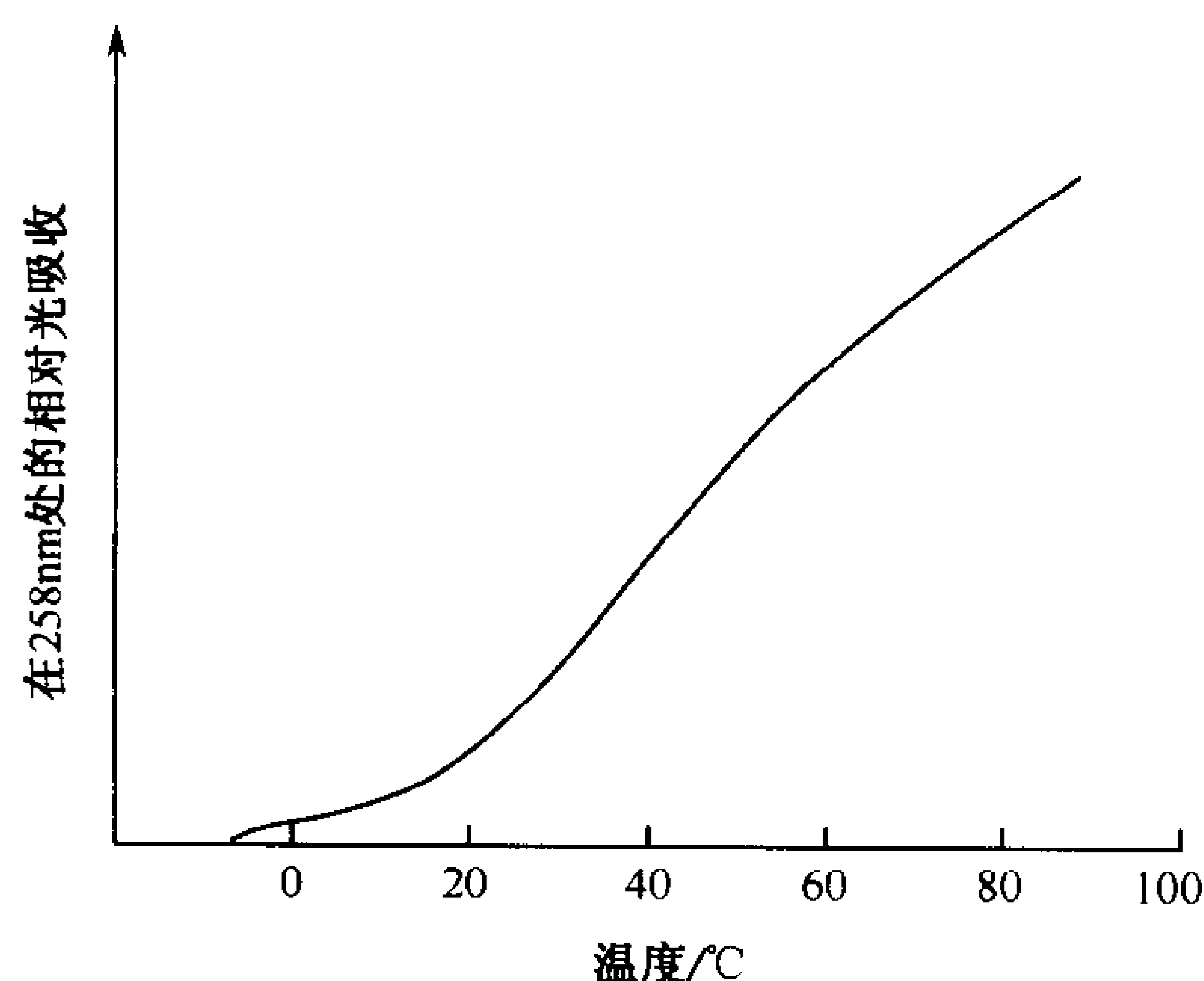


图 23-21　poly(A)的熔解曲线

与图 23-17 相比较，曲线平缓表明非协同构象变化。[引自 Leng, M. 和 Felsenfeld, G., J. Mol. Biol. 15, 457 (1966)]

在水溶液中由疏水作用产生的堆积相互作用

可以假设核酸的疏水作用性质上与稳定蛋白结构的作用相似。实际情况并非如此。回想一下，折叠蛋白主要是通过溶剂水分子熵的增加（疏水作用；节 6-4A）来稳定的；换句话说，蛋白的折叠是逆焓和熵驱动的。相反，热力学测定表明核酸中碱基堆积是焓驱动而逆熵的，该观测结果的理论基础目前尚不清楚。蛋白和核酸疏水作用间的不同反映了核酸碱基极性远大于蛋白侧链的事实（例如腺嘌呤与苯丙氨酸或亮氨酸相比）。无论它们的起因如何，疏水作用在决定核酸结构时起着核心的作用，在 DNA 水溶液中加入非极性溶剂会引起变性可以清楚地证明这一点。

D. 离子相互作用

核酸结构稳定性的任何理论必须考虑核酸中带电磷酸基的静电相互作用。例如，因为 Na^+ 屏蔽了磷酸基负离子间的相互作用，双链 DNA 熔解温度随 Na^+ 浓度而升高。其他诸如 Li^+、K^+ 等一价阳离子也与磷酸基有类似的非特异相互作用。相反，像 Mg^{2+}、Mn^{2+}、Co^{2+} 等二价阳离子能与磷酸基特异结合，因此它们相对一价阳离子而言是更有效的屏蔽试剂。例如，Mg^{2+} 对 DNA 双螺旋的影响比 Na^+ 强 100 到 1000 倍。事实上，与核酸和核苷酸反应的酶常常需要 Mg^{2+} 参与激活，Mg^{2+} 在稳定许多 RNA 的复杂结构方面也扮演着重要角色。

E. RNA 结构

与稳定 DNA 相同的力稳定了 RNA 的结构，其构象柔性同样受限制 DNA 构象的多种因素所制约。事实上，由于大量水分子的存在，使得水能与 RNA 的 2′-OH 基团形成氢键，从而导致 RNA 分子更具有刚性。虽然如此，在形状和大小上 RNA 比 DNA 更呈多样性，并在某些情况下具有催化能力。这些特性导致如下假设：RNA 在 DNA 或蛋白进化以前就实现了早期生命的基本活动（见框 23-2）。

743

核糖体 RNA 包含双螺旋片段

细菌核糖体由三分之二的 RNA 和三分之一的蛋白构成，其中包含 3 条高度保守的 RNA 分子（节 26-3）。最小的一条是有 120 个残基的 **5S RNA**（之所以称为 5S RNA 是因为其超速离心沉

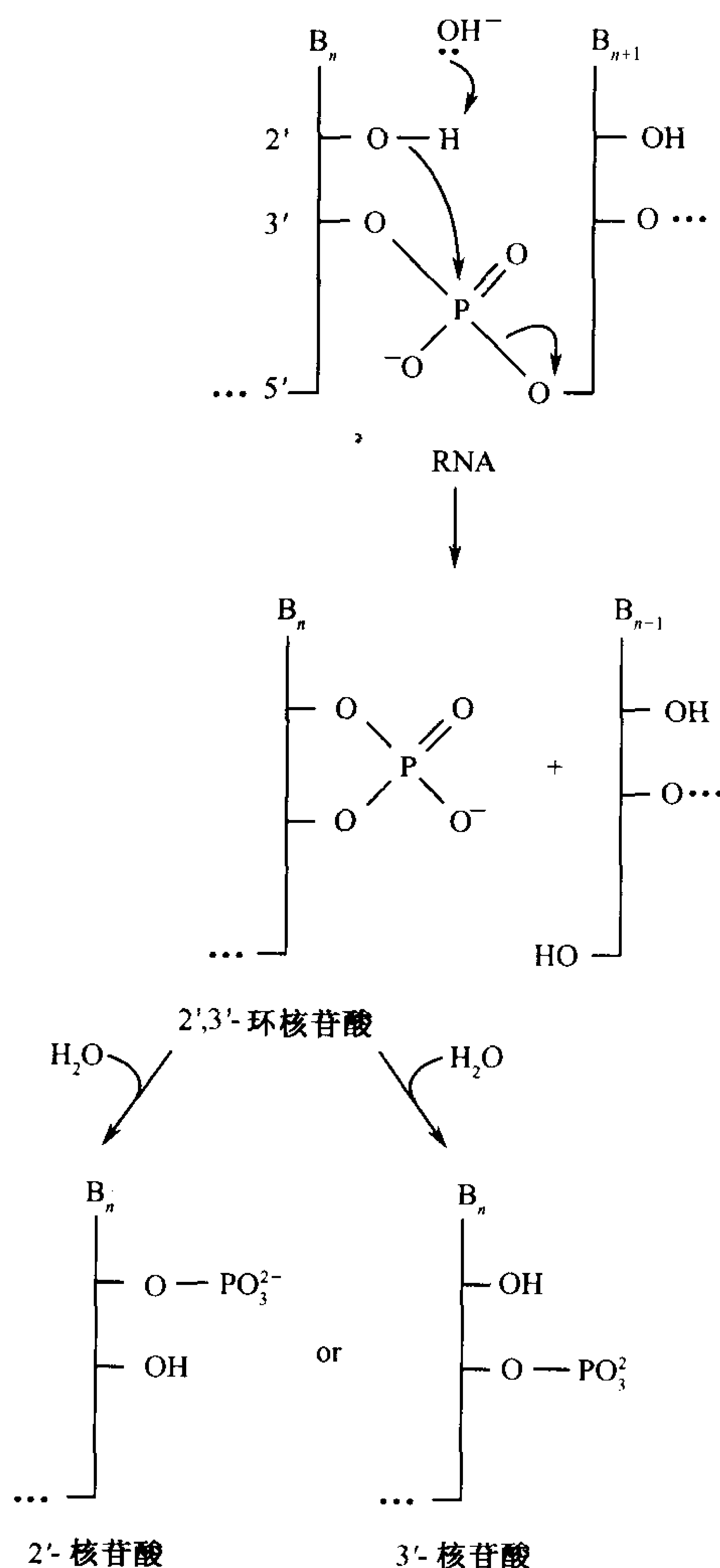
框 23-2 生物化学相关内容

DNA 为什么进化

从原理上说，RNA 分子可以履行蛋白和 DNA 的所有细胞功能。例如，RNA 为核糖体和其他一些亚细胞粒子提供结构骨架，RNA 酶（ribozyme）能催化体内和体外的许多化学反应。另外，RNA 为互补多核苷酸链的合成提供模板，这是基因信息传递的基本标准。实际上，大量病毒将单链或双链 RNA 作为它们的基因物质。

甚至假定 RNA 在原始生命形态中处于显著地位，20 个氨基酸侧链的化学多样性远多于 4 个化学性质类似的核酸碱基，这可以用来轻易地解释作为催化动力源的蛋白质支配地位。然而，对为什么共同选定 DNA 来行使保护、传递基因信息功能的合理性仍需要不同的解释。简言之，DNA 比 RNA 更稳定，因此更适合于这种功能。从左图所示的反应机理来看，RNA 对碱催化水解反应极不稳定。

碱诱导 2′-OH 基团脱质子有利于其对邻近磷原子的亲核进攻，因此切断 RNA 骨架，生成的 2′，3′-环磷酸基随后水解生成一个 2′-或 3′-核苷酸产物。而催化 RNA 水解的核糖核酸酶 A 经几乎同样的反应顺序，仅生成 3′-核苷酸产物（节 11-3A）。因为没有包含磷酸二酯键切割中亲核取代所要求的 2′-OH 基团，在碱性环境下 DNA 不易被降解。DNA 更稳定的化学性质使其更适合作为基因信息长期的储藏仓库。



淀时的速率是 5 Svedbergs（斯维德贝格）（节 5-2E）。在图 23-22a 中，大肠杆菌 5S RNA 核苷酸序列排列成多核苷酸预测的二级结构，也就是说，反平行片段是高度碱基配对的。5S RNA 被温和的核酸酶消化后得到 61 核苷酸片段 I（图 23-22b），其 X 射线衍射结构由 Peter Moore 和 Thomas Stertz 测定。片段 I 呈现出约 94Å 长的类 A-DNA 螺旋，但在 10 个碱基对长度的片段中有几处严重的几何变形，该片段包含在所谓的环 E（其结构表明并不是环）中，并包含了 9 个非 Waston-Crick 碱基对（图 23-22 中的红色碱基；其中两个 A·U 碱基对具有 Hoogsteen 几何构型）。

744

其他大肠杆菌核糖体 RNA 分子的三级结构尚不清楚。计算机对 Harry Noller 测得的大肠杆菌16S RNA 序列（1542 核苷酸）进行处理，常得到许多貌似合理但常常相互矛盾的二级结构。然而，在假设其结构在进化上是保守的前提下，将几个来自原核生物的 16S RNA 进行对照，得到如图 23-23 所示类似花型的二级结构。4 个区域的结构，其中有 46%形成碱基配对，有许多小于 8 个碱基对和一些不完全的碱基对的茎。在 16S RNA 呈现其完全折叠构象时，推测构成各个环的核苷酸可以自由地与核蛋白或者其他邻近的未配对的核苷酸相互作用。

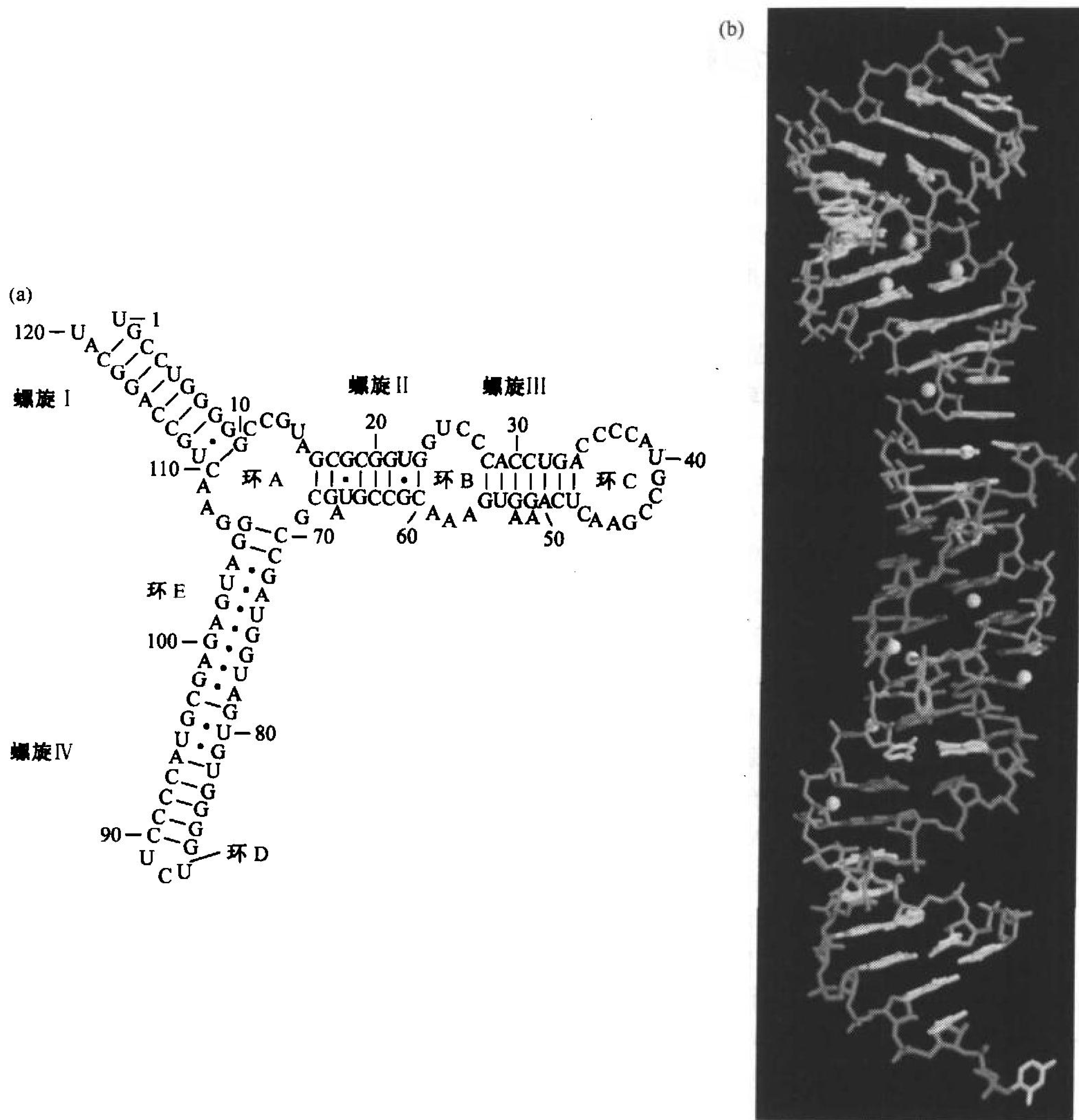


图 23-22 大肠杆菌 5S RNA

(a)核苷酸序列及预测的二级结构。破折号表示 Waston-Crick 碱基对，点表示其他类型的碱基对。[引自 Noller, H. F., Annu. Rev. Biochem. 53, 134(1984)] (b)片段 I(图 a 中的阴影部分)的 X 射线衍射结构。糖-磷酸骨架中残基 1～11、70～88、90～120 分别是青色、洋红色和绿色。在图 a, b 中红色表示环 E 区域内的 9 个非 Waston-Crick 碱基对，其他碱基用黄色标出。与磷酸基氧和碱基基团配位的 Mg^{2+} 用浅蓝色球表示。(引自 Yale 大学的 Peter Moore 和 Thomas Steitz 所提供的 X 晶体结构图)

745 大 RNA 分子大概是多层折叠，类似多区域蛋白(节 6-4C)。RNA 折叠无疑是个协同过程，在结构崩溃到呈现成熟构象之前，伴随着快速形成短序列双螺旋区域，完成整个折叠可能需要数分钟，其中可能包括相对稳定的中间体，也可能需要蛋白的辅助。

由堆积相互作用来稳定转移 RNA

1974 年 Alexander Rich 阐明了与 Phe 构成共价化合物(**tRNA^{Phe}**)的酵母转移 RNA 的三维结

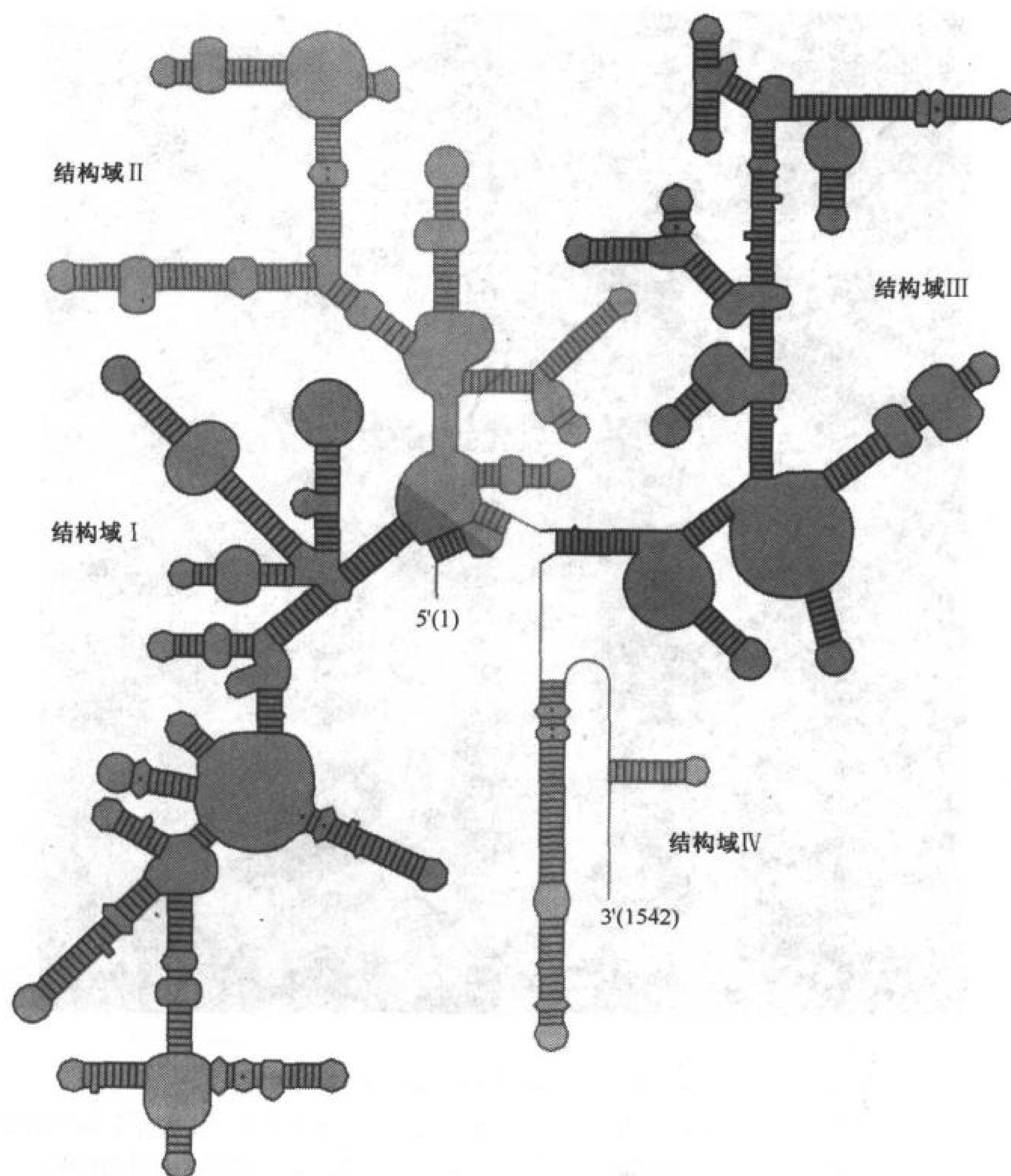


图 23-23 推测的 1542 核苷酸大肠杆菌 16S rRNA 二级结构

在二级结构进化保守性假设的基础上,比较来自不同物种的 RNA 序列而得到的结构,花型系列茎状和环状结构构成 4 个区域。[引自 Gutell, R. R., Weiser, B., Woese, C. R., 和 Noller, H. F., Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol. 32, 183(1985)]

构,此工作是他和他的同事 Sung-Hou Kim 以及和 Araon Klug 在不同晶体形式方面的合作下完成的。此分子结构紧密,成 L 型,L 型结构的每个分支约 60Å 长(图 23-24)。酵母 $tRNA^{Phe}$结构的复杂性使我们想起蛋白的复杂结构,尽管 76 个碱基中只有 42 个形成双螺旋茎干,但有 71 个碱基参与了堆积缔合作用。 746

用包括三碱基间的氢键结合在内的共价修饰的碱基和不寻常的碱基对,来描述 tRNA 的结构特征,这些三级相互作用对 tRNA 的紧密结构有相当的贡献(tRNA 结构将在节 26-2A 中详细讨论)。

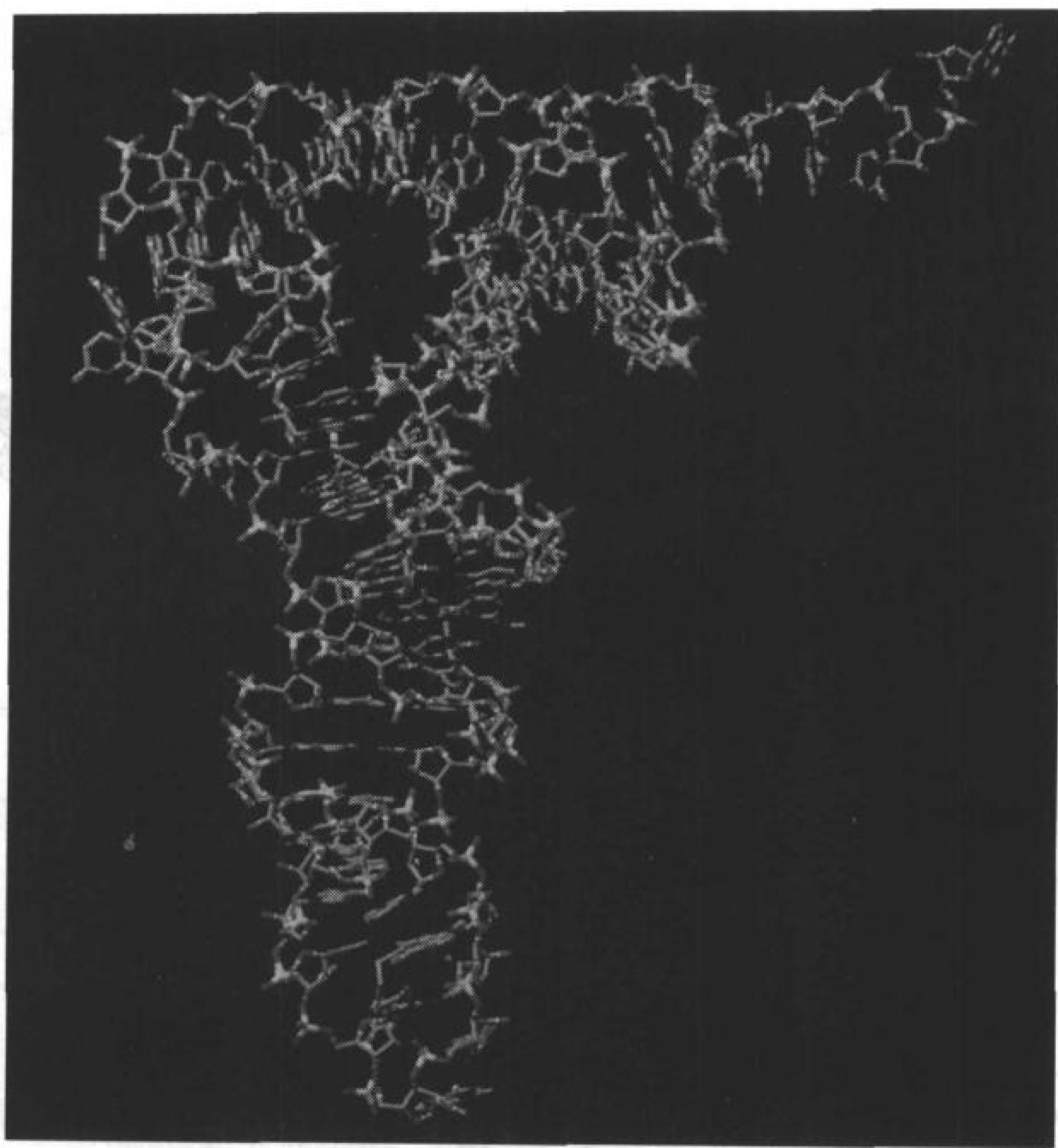


图 23-24 酵母 $tRNA^{Phe}$的 X 射线衍射结构图
由棒式图表示 76 核苷酸 RNA, C、N、O、P 原子分别用绿色、蓝色、红色、金色表示。注意 L 型分子的两臂均由双螺旋茎干构成。(由麻省理工的 Alexander Rich 和 Sung-Hou Kim 提供 X 射线结构图)

锤头核酶具有催化活性

另一个已知三级结构的 RNA 分子复合物是存在于某种植物病毒 RNA 中的**锤头核酶**(hammerhead ribozyme) 。从字面上就可以看出核酶是具有类似酶催化活性的 RNA。与 RNase A(节 11-3A)作用相同,锤头核酶在 RNA 转录后过程中切割特定的 RNA。锤头核酶结构中有 3 个双螺旋茎干和 1 个包含两个非螺旋片段的保守核心(图 23-25a)。

由 Aaron Klug 测定的锤头核酶 X 射线衍射结构显示它实际上构成 3 个 A 型螺旋片段,虽然它的重叠的形状更像叉骨而非锤头,螺旋茎中的核苷酸由普通的 Waston-Crick 碱基对构成。

747

正如我们将看到的一样,核酶参与了生命体内基因信息表达过程中的许多必需过程,合成 RNA 的催化多功能性甚至更大。通过寡聚核苷酸合成或分子克隆技术(节 3-5),可得到一个大的 RNA 分子库,并筛选出具有配体结合和催化活性的 RNA。对与其他高亲和性分子($K \approx 10^{-5}$mol/L)结合的 RNA 的 NMR 研究表明,这些被称之为**适体**(aptamer)的 RNA 呈现出紧密的构象,以至于多种功能基团互相靠近形成结合口袋。对具有催化活性的 RNA 分子的研究指出,RNA 分子能催化的反应类型并没有任何限制,其中包括磷酰基转移、C—C 键异构化和

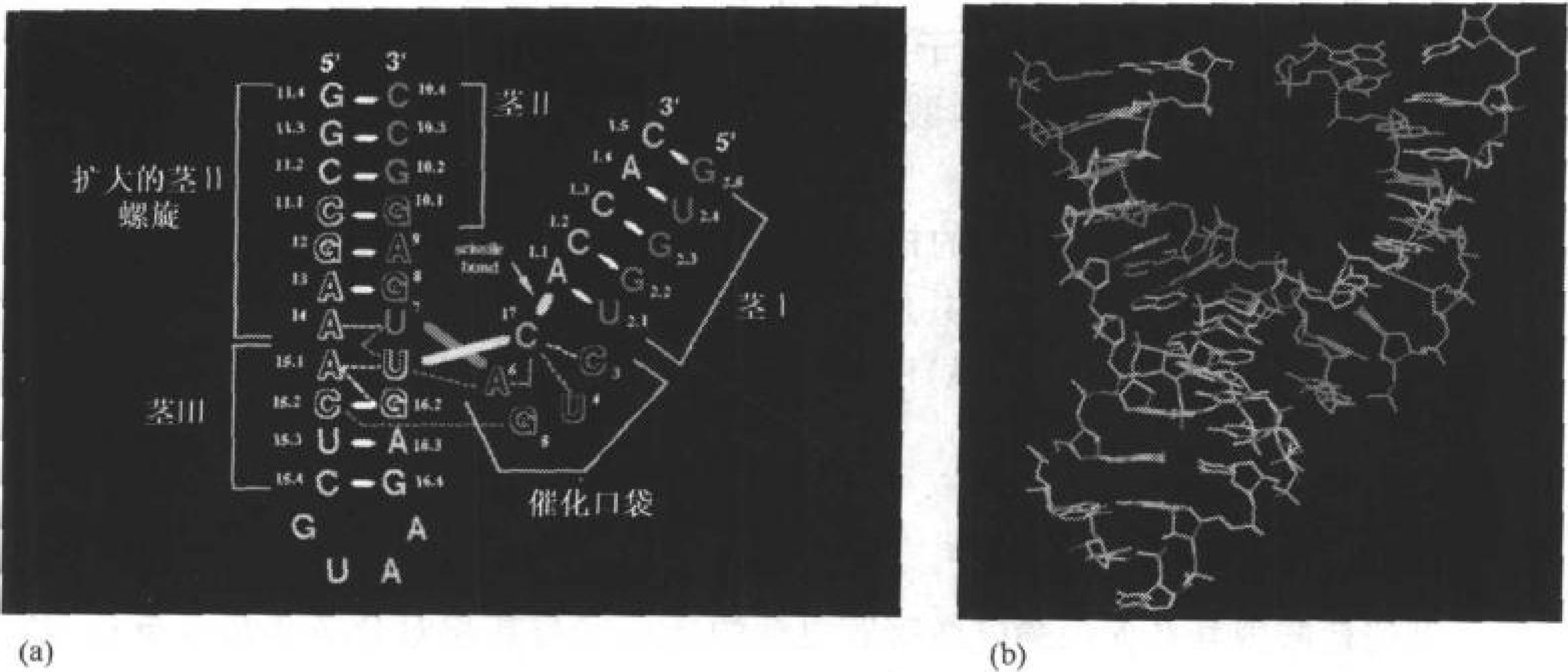


图 23-25　锤头核酶的 X 射线衍射结构图

(a) 核酶序列和图解结构，用红色表示 16 核苷酸酶链，用黄色表示 25 核苷酸支链，用绿色表示切割点碱基(C17)。用编号的阴影字表示必需核苷酸。用白色椭圆形表示 Waston-Crick 碱基对与两个G·A Hoogsteen碱基对的相互作用，用白色虚线表示非 Waston-Crick 碱基间的单个氢键，由洋红色虚线表示碱基与骨架核糖之间的单个氢键，用绿色虚线表示 C17 与催化口袋间的芳香性相互作用。(b)用与图 a 相同颜色标示的棒式图。(由英国剑桥分子生物学实验室的 Aaron klug 提供)

水解反应。这些结构暗示核酶结构具有蛋白酶的所有特征：能支持与底物的特定结合、邻近效应、定向效应和过渡态稳定性(节 11-3)。

3. 核酸分离

在节 5-2 中我们讨论了分离和鉴定蛋白的各种方法。大多数方法经过修正以后，可依据其大小、组成和序列等来分离核酸，也有许多技术只能应用于分离核酸。在这一节中，我们将核酸分离中一些最有用的方法作一简单介绍。

细胞中的核酸总是与蛋白结合在一起的，一旦细胞破裂，其核酸通常会脱蛋白化。可以将蛋白-核酸混合物放在苯酚溶液中振荡，使蛋白沉淀，并通过离心分离来实现核酸与蛋白的分离。748 另外，也可以用去污剂、氯代胍基或高浓度盐溶液来使蛋白和核酸分离。此外，也可以用蛋白酶降解蛋白质。在所有情况下，作为 RNA 和 DNA 混合物的核酸都能被乙醇沉淀。将沉淀物用胰腺脱氧核糖核酸酶(DNase)处理以除去 DNA，从而得到 RNA，相反用核糖核酸酶(RNase)处理可以得到 DNA。

在所有这些或随后介绍的方法中，必须小心保护核酸以防止被核酸酶降解，而这些核酸酶在所用的实验材料和人的手上都有。核酸酶可以被像 EDTA 那样的螯合试剂所抑制，因为它们可以掩蔽激活核酸酶的二价金属离子。可以用加热来去除实验室的玻璃器皿上的核酸酶。核酸通常也比蛋白质更容易处理，因为核酸缺乏复杂的三级结构，因此可以经受相对极端的条件。

A. 层析法

许多用于分离蛋白质的层析技术(节 5-2C)同样可以用于核酸的分离。然而，**羟基磷灰石**

(hydroxyapatite),一种磷酸钙盐[$Ca_5(PO_4)_3OH$],在层析法提纯和分离 DNA 时特别有用。双链 DNA 与羟基磷灰石的结合远比其他分子要牢固,所以,可以将细胞胞解产物通过羟基磷灰石柱,用浓度低到只释放 RNA 和蛋白质的磷酸缓冲液冲洗柱子,然后用浓磷酸盐溶液洗脱得到 DNA,从而达到快速分离 DNA。

亲和层析法可用于分离某些特定的核酸。例如,大多数真核信使 RNA(mRNA)在其 3′端有一段 poly(A)序列(节 25-3A),可以用共价结合有 poly(U)的琼脂糖或者纤维素分离这些 mRNA。在高盐溶液和低温下这些 poly(A)序列可以特异结合在互补的 poly(U)上,并能在条件改变后释放出来。

B. 电泳

指定类型的核酸因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳的迁移率与其相对分子质量成反比,故可以通过聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离(节 3-4B)。然而,有几千个碱基的 DNA 不能通过即使是弱交联度的聚丙烯酰胺凝胶,它们必须在琼脂糖胶上进行分离。即使凝胶中仅含有 0.1% 琼脂糖(此

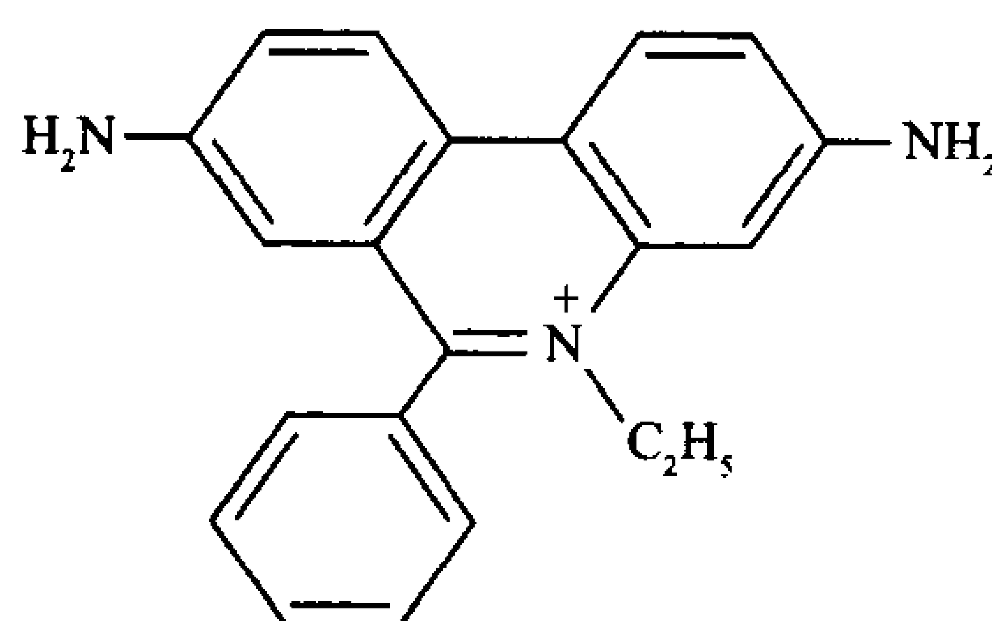


图 23-26 一组大小不同的噬菌体 DNA 分子脉冲电场凝胶电泳图
泳道 A 和 E 是相同的样品。DNA 大小由顶向底递减(它们的迁移率递增)。
(由波士顿大学的 Charles Cantor 提供)

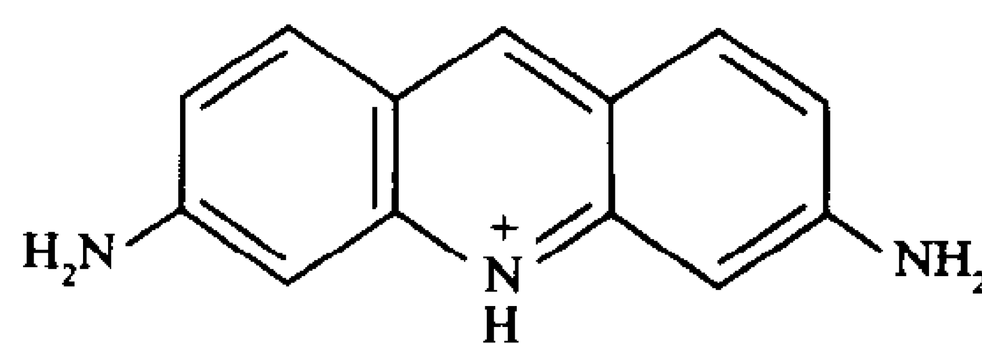
时凝胶是非常容易破碎的)，传统凝胶电泳也只能用于分离<100 000 碱基对的 DNA。Charles Cantor 和 Cassandra Smith 发展了**脉冲电场凝胶电泳**(PFGE)，使这个限制提高到 1 千万碱基对(6.6×10^6 kDa)。在 PFGE 使用的电泳装置中，通常在琼脂糖平板凝胶的四周排列两对甚至更多的电极。根据待分离的 DNA 分子大小，不同的电极对依次发出从 0.1～1000 秒变化的脉冲。DNA 凝胶电泳要求这些延展的分子在凝胶复杂的沟道中从阴极缓慢移向阳极，如果电场突然改变，DNA 分子在继续穿越凝胶前必须重新调整其沿新电场方向的长轴，非常长的 DNA 分子重新定向所需的时间显然与其大小有关。电极分布和脉冲长短的正确选择，可以使短 DNA 远比长 DNA 快速迁移通过凝胶，从而达到分离的目的(图 23-26)。 749

嵌入试剂染色双链 DNA

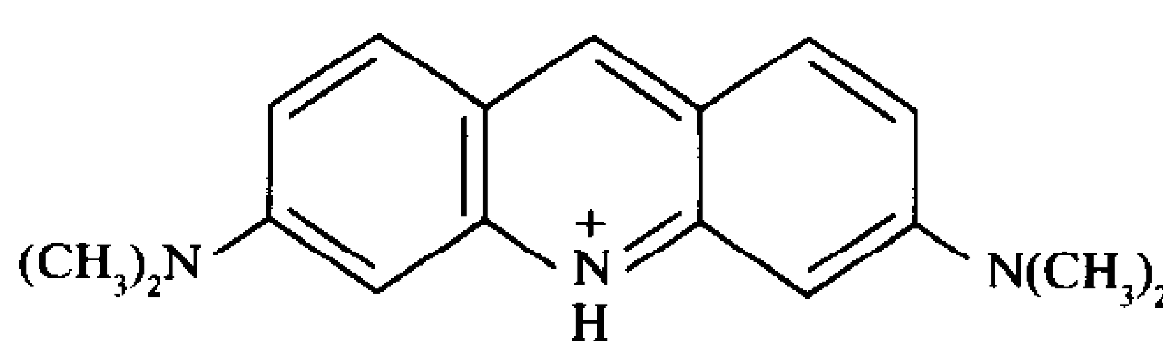
用诸如**乙锭离子**、**3,6-二氨基吖啶**和**吖啶橙**平面芳香阳离子可以对凝胶中不同 DNA 片段染色。这些染料通过**嵌入**(intercalation)结合在双链 DNA 分子上(插入堆积的碱基对间，如图23-27)，插入后这些染料在紫外光照射下呈现出远比游离染料分子强的荧光。用溴化乙锭染色可以检测凝胶中 50ng 的 DNA。单链 DNA 和 RNA 同样可以激发乙锭离子的荧光，但远比双链 DNA 弱。



乙锭离子



3,6-二氨基吖啶



吖啶橙

具有特定序列的 DNA 印迹法(Southern blotting)鉴定

具有特定碱基序列的 DNA 可以用 Edwin Southern 发明的 **DNA 印迹法**(Southern blotting)来测定(图 23-28)。该过程利用了硝酸纤维素对单链 DNA 的强黏合力而不与双链 DNA 作用的特点。在双链 DNA 凝胶电泳后，将凝胶浸泡在 0.5mol/L NaOH 溶液中使 DNA 变成单链形式，然后用硝酸纤维素试纸覆盖在凝胶上，将一叠吸水试纸叠在纤维的远端以强迫凝胶中的分子穿过硝酸纤维素，或是通过电泳过程[**电印迹**(electroblotting)]，单链 DNA 与硝化纤维素结合的位置与其在凝胶中的相同。经过 80℃ 干燥，将 DNA 永久性地固定，随后将硝酸纤维素试纸用最小量的溶液浸润，该溶液中含有感兴趣的用^{32}P 标记的 DNA 片段互补序列的单链 DNA 或 RNA 探针，润湿的硝酸纤维素试纸在适当的复性温度下放置数小时，以使探针与其目标序列杂交，洗掉没有杂交的放射性探针，晾干，然后将其放置在一张 X 线片上进行放射自显影，与放射性探针分子互补的分子位置则由显影胶片的黑度来指示。 750

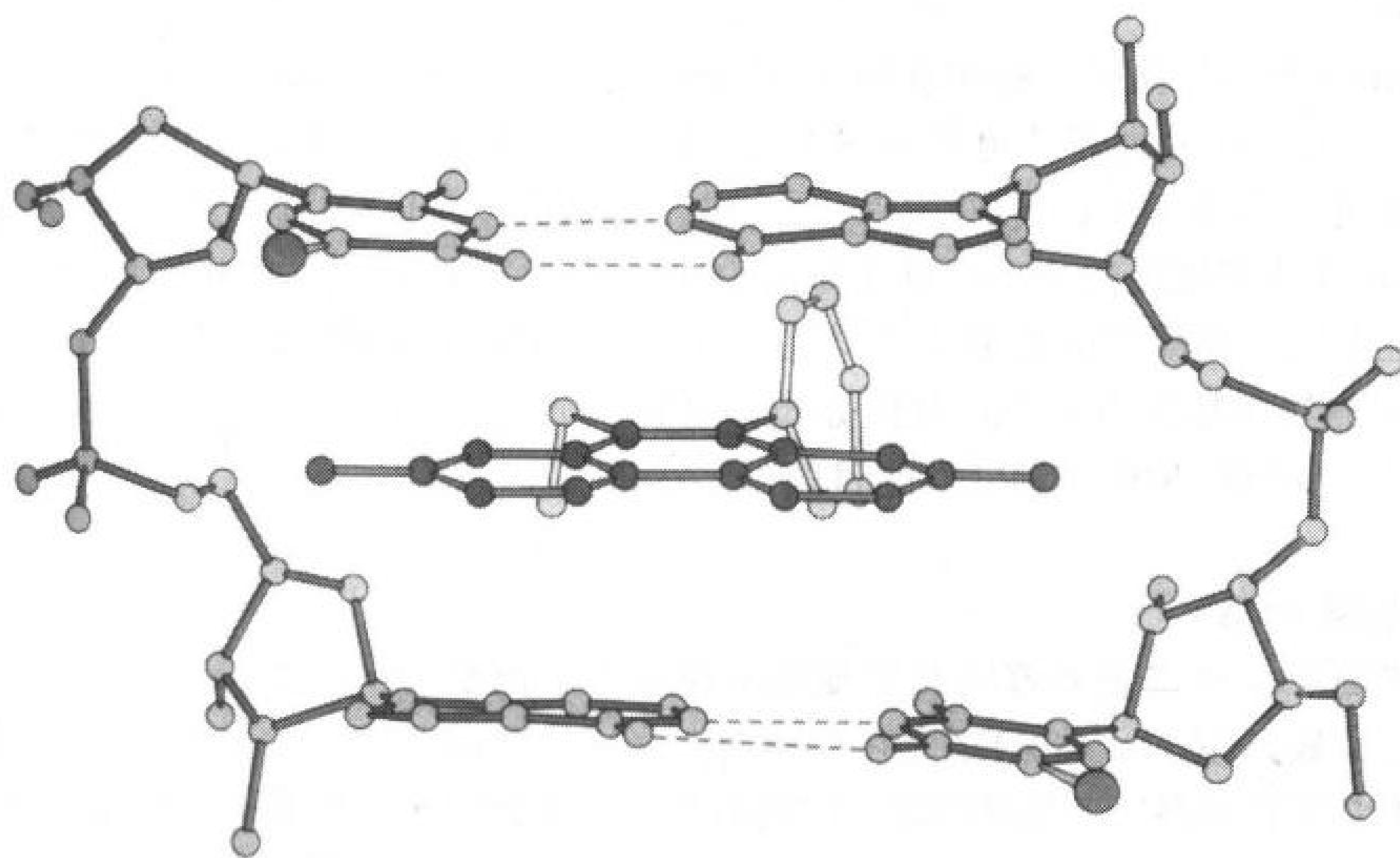


图 23-27 乙锭离子与 5-碘-UpA 复合物的 X 射线衍射结构图

乙锭离子(红)嵌入双螺旋配对二核苷的碱基对之间,并因此提供了乙锭与双链 DNA 的结合模型。[引自 Tsai, C. -C., Jain, S. C., and Sobell, H. M., Proc. Natl. Acad. Sci. 72, 629(1975)]

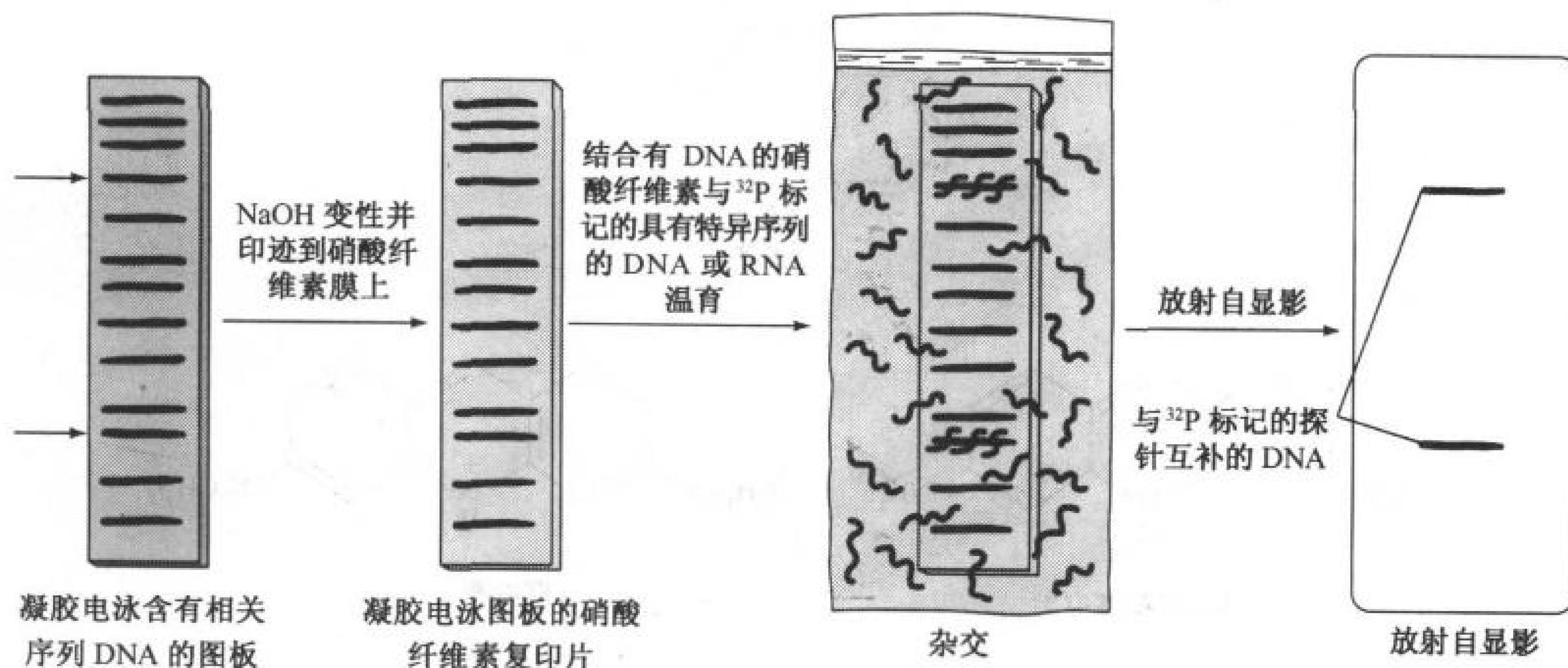


图 23-28 用 DNA 印迹检测含有特定碱基序列的 DNA

特定 RNA 片段也可以通过改良的印迹法来检测,俏皮地命名为 **RNA 印迹**(Northern blot)。在该方法中,RNA 固定在硝酸纤维素试纸中,并用互补的带放射性的 RNA 或 DNA 作标记。用类似的方法也能检测特定蛋白,在**免疫印迹法**(immunoblot, Western blot)中,采用与 ELISA 中类似的程序(节 5-3),抗蛋白的抗体来进行检测。

C. 超速离心

CsCl 平衡密度梯度超速离心是最常用的 DNA 分离方法(节 5-2E)。双链 Cs^+ DNA 的浮力密度取决于其碱基组成,具有高 G+C 的 DNA 分子有较高的密度(图 23-29)。

751

单链 DNA 比相应的双链 DNA 的密度大约 $0.015 g \cdot cm^{-3}$,因此通过平衡密度梯度超速离心

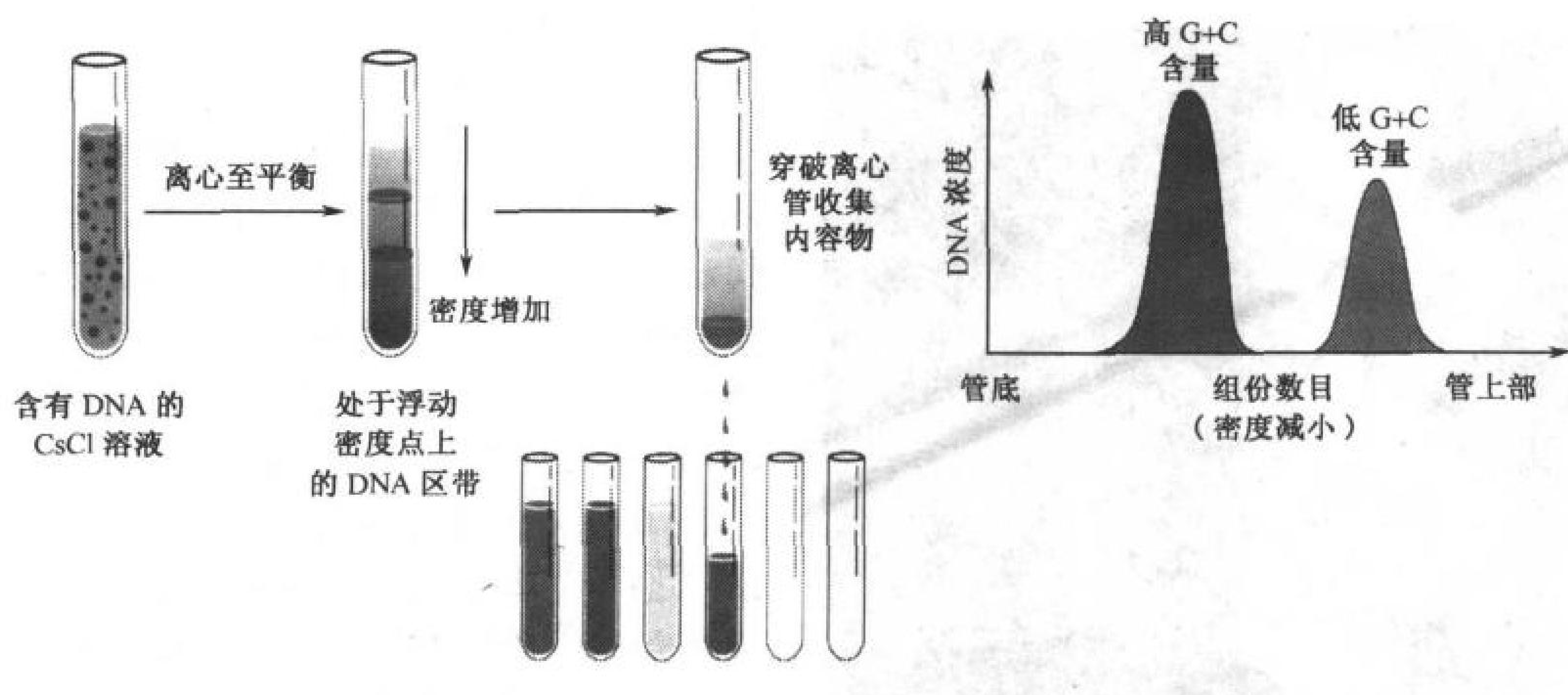


图 23-29　在 CsCl 溶液中用平衡密度梯度超速离心分离 DNA

初始浓度 8mol/L 的 CsCl 溶液构成一线性密度梯度，在离心试管底部密度约 1.80 $g\cdot cm^{-3}$，顶部约 1.55 $g\cdot cm^{-3}$。DNA 的沉降速率取决于碱基组成，可以用它的 UV 吸收（通常在 260 nm）来估算每组分的 DNA 量。

可以将它们分离。用同样的方法也可以将环状 DNA 分子与线性 DNA 分离开来。

RNA 太重以至于不能在 CsCl 中分带，但在 Cs_2SO_4 溶液中可以分带。RNA-DNA 杂交带在 CsCl 中分带，但比对应的双链 DNA 具有更高的密度。用蔗糖梯度的区带超速离心同样可以进行 RNA 的分离，RNA 多半按其大小用此方法分离。

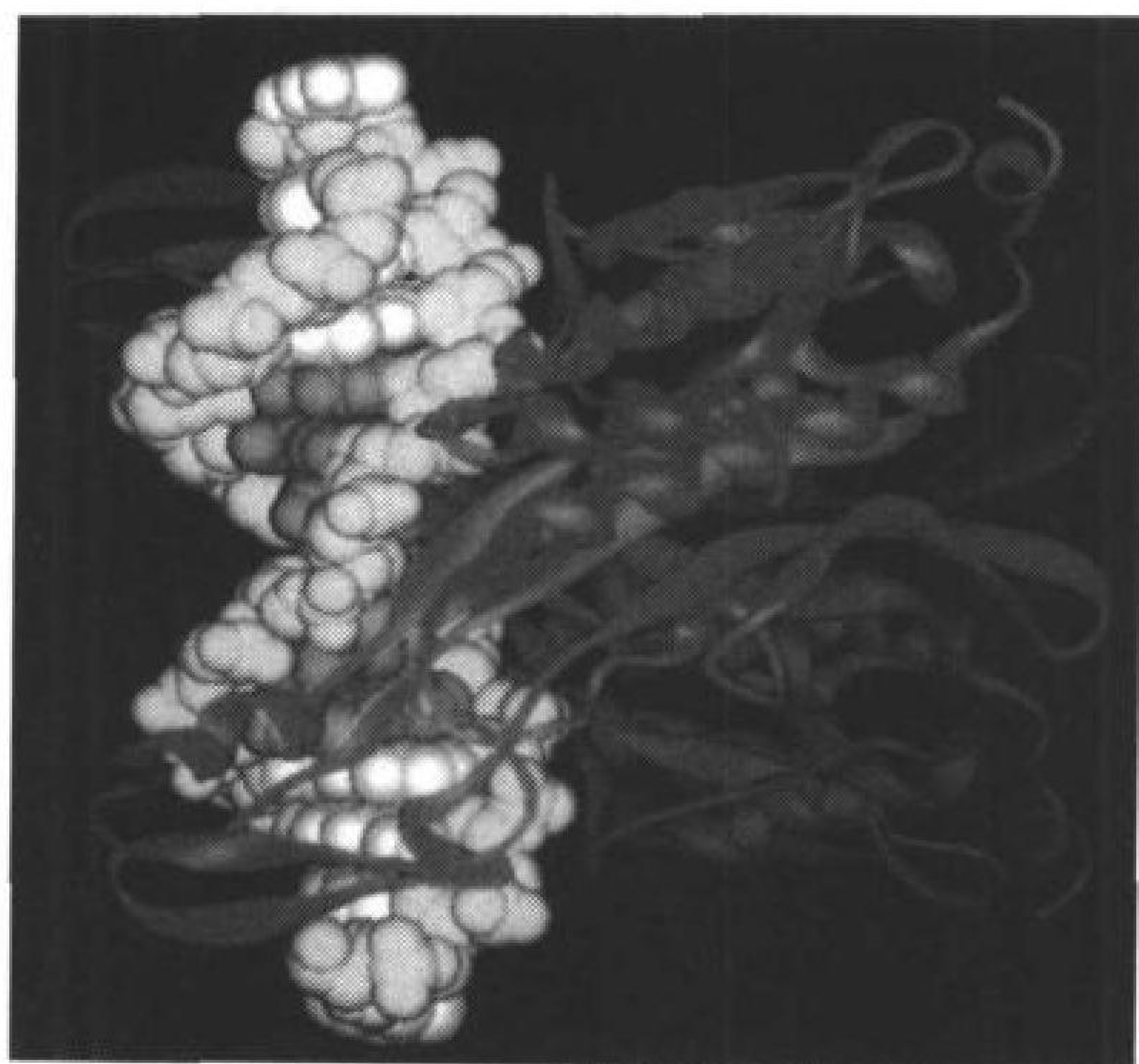
4. DNA-蛋白质相互作用

从某种意义上说基因信息的表达是依赖于蛋白识别 DNA 和与 DNA 作用的能力，以将编码信息拷贝为 DNA（复制）或 RNA（转录）。在这些过程的最基本的步骤中，需要许多蛋白质的参与，需要它们之间的相互作用或它们与核酸的相互作用。另外，机体调节大多数的基因表达，都需要其他蛋白作为转录过程的阻遏物或激活剂。

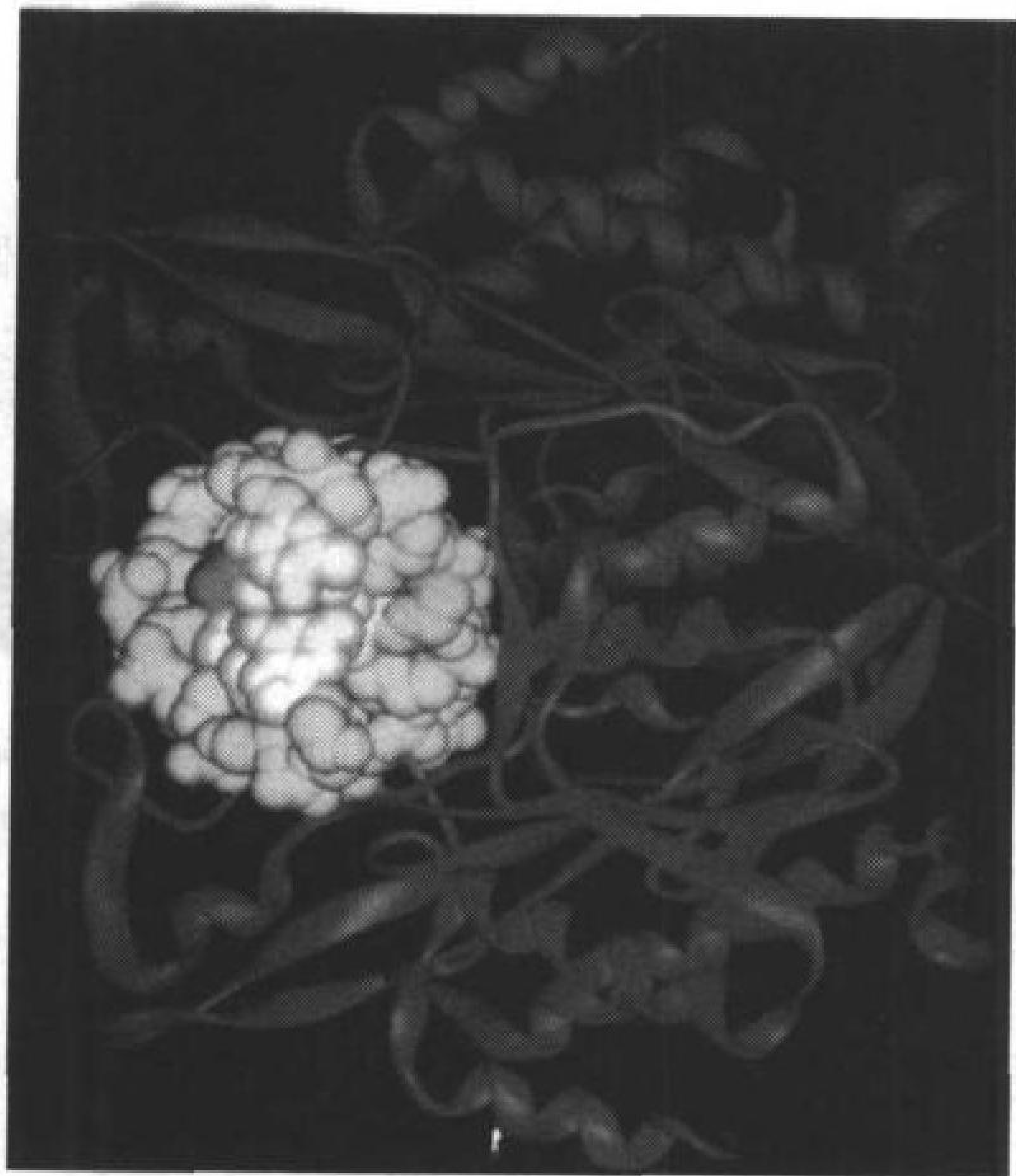
许多蛋白非特异性结合到 DNA 上，也就是说，不需要考虑核苷酸的序列。例如，组蛋白（参与 DNA 的包裹；节 23-5A）和某种 DNA 复制蛋白（该蛋白必须有可能与有机体基因组所有序列相互作用）首先通过蛋白官能团与 DNA 的糖-磷酸骨架相互作用结合到 DNA 上。能识别特定 DNA 序列的蛋白也能非特异性、松散地结合到 DNA 上，使其在特异紧密结合到 DNA 前能沿多核苷酸链搜索目标序列。特异序列 DNA-蛋白相互作用必须是非常精密的，以使这些蛋白能在人体基因组几十亿碱基对中进行位点选择以发挥其作用。这些蛋白是如何与其 DNA 上的靶点相互作用的呢？

752

特异序列 DNA 结合蛋白通常并不破坏它们结合的双链 DNA 上的碱基对。然而，这些蛋白的确通过凸现在 DNA 大沟和小沟中的碱基对官能团来区别 4 种碱基对（A·T，T·A，G·C 和 C·G）。如图 23-2 所示，这些官能团在 B-DNA 的大沟中远比在狭窄的小沟中暴露。此外，大沟中比小沟中包含更多的特定序列基团（图 23-1）。DNA-蛋白结合相互作用主要采用氢键的形式，包括插入水分子，虽然氢键可能只是间接的作用，同时也存在与骨架离子的相互作用。大多数情形下，相互结合的二者之间的互补性可以通过“诱导楔合”现象来提高，在“诱导楔合”中，为提高其



(a)



(b)

图 23-30 *Eco*RI 核酸内切酶与 DNA 形成复合物的 X 射线衍射结构

双链 DNA 片段含有自身互补序列 TCGCGAATTCGCG(在两个 5′末端均连有一个 T 结构的 12 碱基对;下划线表示酶识别的六碱基目标序列),并用空间填充模式表示。其糖-磷酸骨架链为黄色,识别序列碱基青色,其他碱基为白色。蛋白用飘带形式表示,其完全相同的两个亚单元分别为红色和蓝色。复合物结构如图所示(a)与 DNA 螺旋轴垂直(b)从末端观察。在两幅图中,复合物二重轴是水平的,DNA 的大沟向右(指向蛋白)。

(引自美国匹兹堡大学的 John Rosenberg)

753

稳定性,蛋白和核酸改变其构象。在某些情形下,这些改变允许结合蛋白与其他蛋白相互作用或改变 DNA 与其他分子的亲和性。

稳定 DNA 蛋白相互作用的力必然来自于稳定蛋白(节 6-4A)和核酸(节 23-2)的力,但因为对 DNA 的稳定性并没有完全了解,对形成 DNA-蛋白复合物的认识也是很模糊的。然而,毫无疑问这些力都是必需的。大多数 DNA-蛋白复合物的解离常数在 10^{-9}~10^{-12} M^{-1}之间;这些数值表明特异性结合比非特异性结合要强 10^3~10^7 倍。下面,我们介绍一些特异 DNA-蛋白结合的实例,在后续章节中我们将会遇到更多的核酸-蛋白相互作用的例子。

A. 限制性内切核酸酶

限制性内切核酸酶 II 在特定位点切断没有被宿主修饰系统的甲基化酶甲基化的 DNA,从而裂解外来 DNA 的细菌细胞(节 3-4A)。限制性内切核酸酶能识别 4~8 个碱基对的特殊的回文 DNA 序列,此结构中仅仅一个碱基的改变都能使它们的活性减小百万倍,这种高效特异性就能防止在 DNA 其他位点的意外切割。

John Rosenberg 测定了 *Eco*R I 内切核酸酶与含有酶识别序列的一段 B-DNA 复合物的 X 射线衍射结构。DNA 结合在由 276 个残基构成的两个完全相同的亚单位的二聚酶形成的对称裂缝中(图 23-30),有 DNA 回文识别序列。蛋白的结合引起识别序列中心两个碱基对之间的二面角向小沟方向张开约 50°。因此这些碱基对变为非堆积的,但 DNA 因毗邻碱基对的补偿弯曲而仍保持直线性。虽然如此,这仍使 DNA 展开约 28°,在识别位点处大沟变宽 3.5Å。在每个蛋白亚单元中,一对平行螺旋的 N 末端插入变宽的大沟中,并与识别序列处碱基形成氢键网络,磷酸二酯键切割位点位于离回文结构中心两个碱基的地方(表 3-3)。

其他一些限制性内切核酸酶,包括 *Eco*R V(图 23-31),同样诱导 DNA 的绞缠,在某些情况

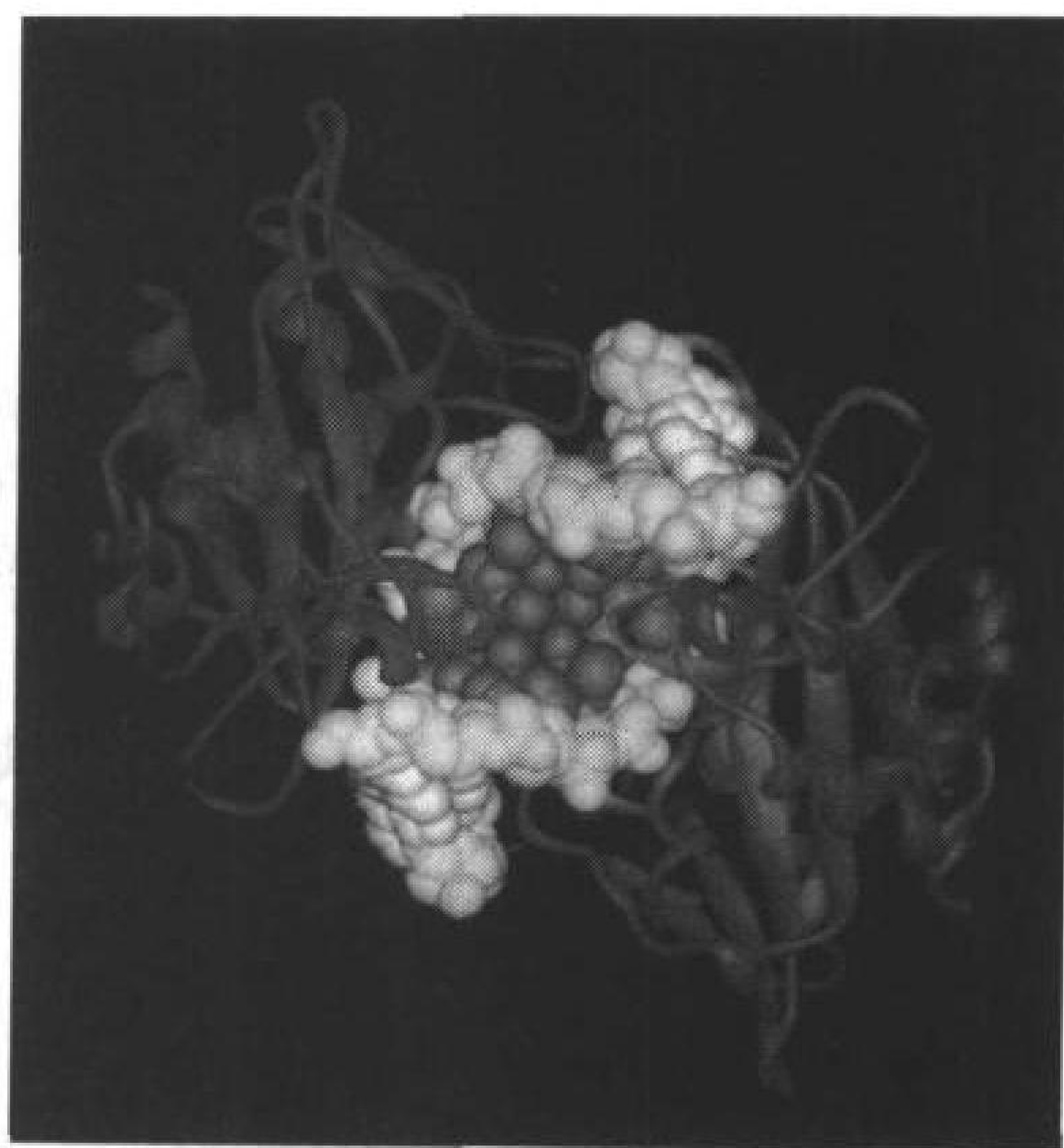
下是扩展小沟、压缩大沟。然而，**核苷酸碱基、蛋白侧链和骨架基团间的互补氢键，而不是DNA自身的变形，是特异序列内切核酸酶-DNA复合物形成的先决条件。**例如，在*Bam*HI-DNA复合物中，识别位置的大沟中每个潜在的氢键给体和受体都参加到与蛋白形成直接或以水为中介的氢键中，没有其他的DNA序列能与*Bam*HI形成这种程度的互补性。

B. 原核生物转录控制超二级结构

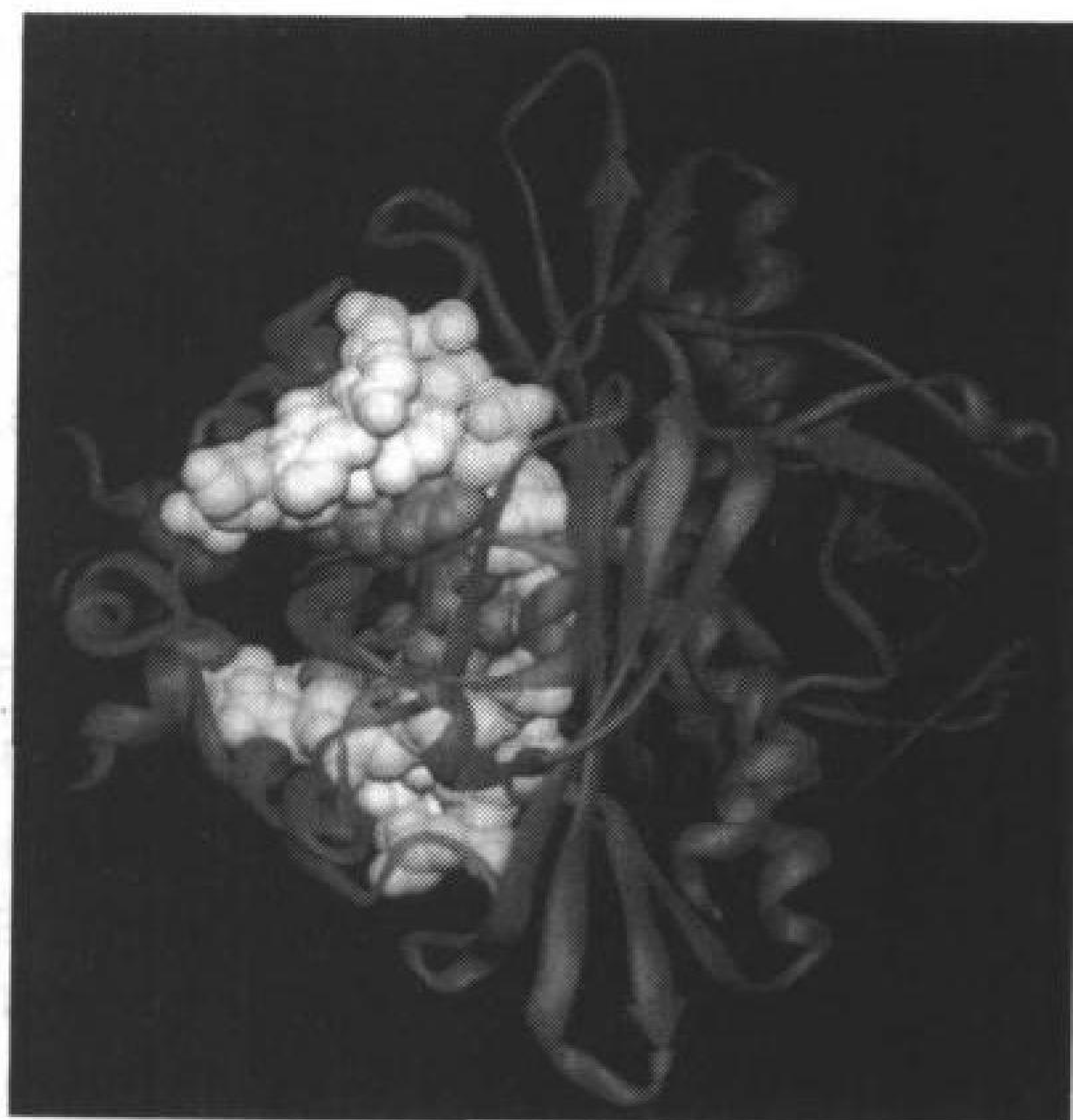
在原核生物中，许多基因的表达至少部分受**阻遏物**[repressor，一种通过结合或靠近基因以阻止其转录(节27-2)的蛋白]控制。这些阻遏物常常包含约20残基的多肽片段，形成一个**螺旋-回转-螺旋(HTH)**超二级结构，它包含两个α-螺旋并以约120°相交叉。显然，与进化相关的HTH超二级结构，虽然都与DNA结合，但作为结构域的组成部分出现，常常具有多变的结构。注意只有当HTH超二级结构是大蛋白的组分时，它在结构上才是稳定的。

类似限制性内切核酸酶识别位点，阻遏物结合的序列[称之为**操纵子**(operator)]表现为回文对称或者接近这类结构。阻遏物与DNA的相互作用并非完全对称的。典型的阻遏物是个二聚体。结合过程包括从HTH超二级结构的第二个螺旋(识别螺旋)延展出来的氨基酸侧链与DNA的碱基、糖-磷酸链之间的相互作用。

Stephen Harrison 测定了来自于**噬菌体434**的二聚体阻遏物与其20碱基长度的识别序列复合物的X射线衍射结构。**434阻遏物**与DNA以二重对称方式结合，每个亚基中的识别螺旋结合在DNA大沟的连续弯折中(图23-32)。阻遏物非常接近DNA表面，通过复杂的氢键网络、盐桥和范德华作用力与其碱基对、糖-磷酸链相互作用。在阻遏物-DNA复合物中，DNA朝向蛋白弯曲成直径约65Å的一个弧，其小沟在中心位置被压缩约2.5Å



(a)



(b)

图23-31　*Eco*RV内切核酸酶与DNA复合物的X射线衍射结构

双链DNA片段含有自身互补序列GG<u>GATATC</u>CC(用下划线表示酶识别的六碱基目标序列)。DNA和蛋白如图23-30一样着色。(a)沿其二重轴观察，面向DNA大沟。压在大沟上的两个对称相连的蛋白环(由残基182～186构成)仅仅是酶的一部分，它使得特定碱基与DNA接触。(b)从图a的右侧观测复合物(DNA的大沟面向左侧)。注意蛋白是如何朝大沟的方向绞缠DNA的。(引自Fritz Winkler，Hoffman-LaRoche的X射线衍射结构)

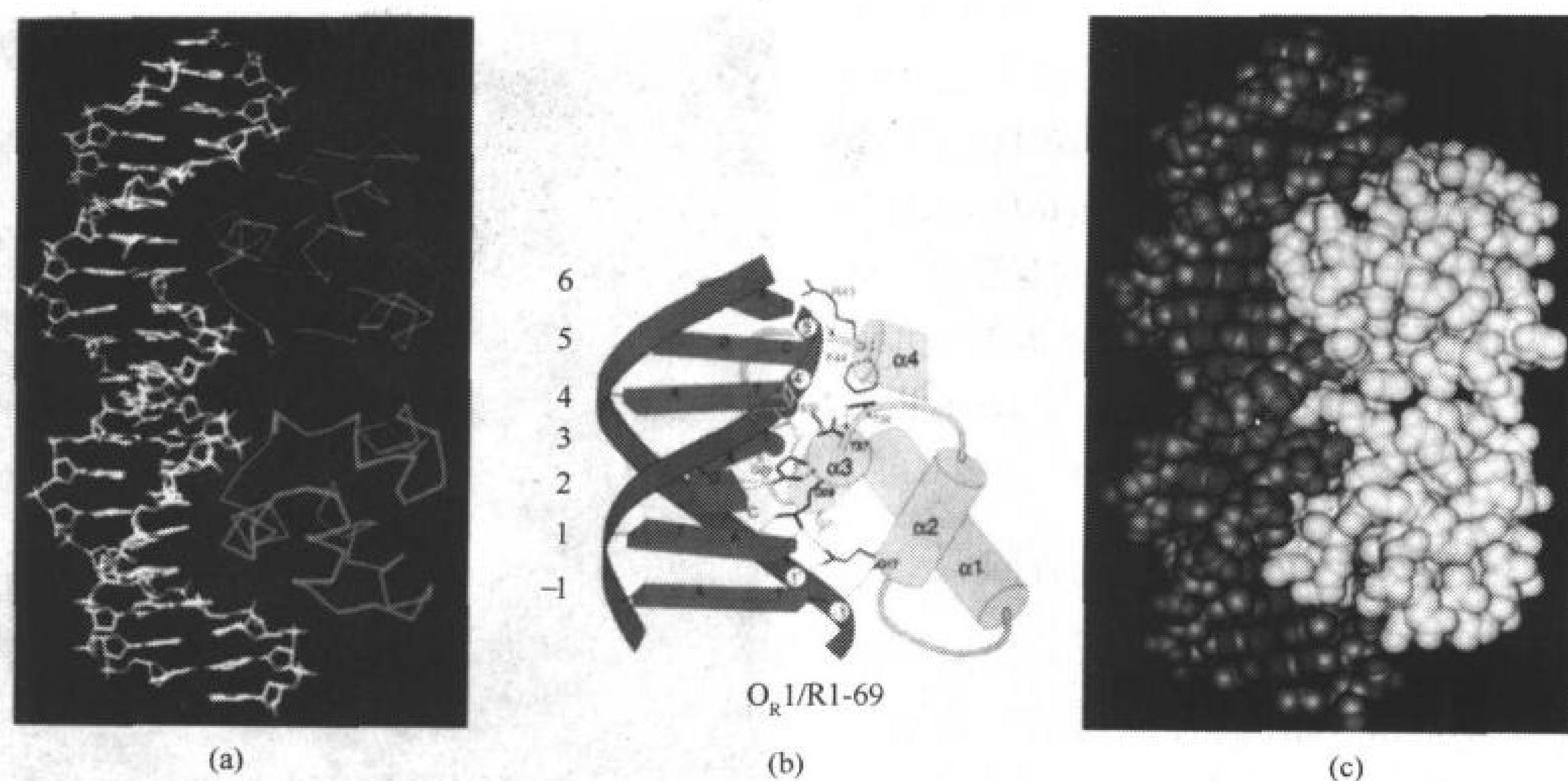


图 23-32 噬菌体 434 阻遏物与其靶 DNA 复合物的部分 X 射线衍射结构

左侧 20bp 的 DNA 链含有如下的序列 d(TATACAAGAAAGTTTGTACT)。(a) 框架模型显示了 DNA 与蛋白的两个等同亚基的前 63 个残基(蓝色和红色,仅表示 C_α 骨架)。(b)图示了 HTH 超二级结构(包含螺旋 α2 和 α3)是如何与 DNA 相互作用的,残基用单字母代号表示。由多肽链中出来的短条代表肽链的 NH 基,点线代表氢键,带圈的数字代表 DNA 磷酸酯。小圆圈代表水分子。(c) 与 a 相应的空间填充模型,所有蛋白的非氢原子用黄色表示。

(引自美国哈佛大学的 Aneel Aggarwal, John Anderson, 和 Stephen Harrison)

(在两个蛋白单体之间),朝它的末端放宽约 2.5Å。

大肠杆菌 *trp* 阻遏物与 DNA 间接结合

大肠杆菌色氨酸阻遏物(*trp* repressor)调节色氨酸生物合成所需的基因转录(节 27-2C)。Paul Sigler 测定了该蛋白与 DNA 形成复合物的 X 射线衍射结构,此 DNA 含有单链序列为 TGTACTAGT TAACTAGTAC 的 18bp 回文结构(色氨酸阻遏物靶序列用下划线标出),它十分像色氨酸操纵子。正如所料,同二聚体阻遏物蛋白同样具有 HTH 超二级结构,其识别序列螺旋与 DNA 的连续大沟结合,每一个都与操纵子的半序列(ACTAGT,图 23-33)接触。在色氨酸阻遏物和 DNA 非酯化磷酸氧原子间存在大量的氢键作用。然而,令人吃惊的是并没有直接的氢键或非极性接触能解释阻遏物对其操纵子之间的特异性,更正确地说,所有的(除了一个外)侧链-碱基氢键相互作用是通过水分子连接的。此外,操纵子含有的几个碱基对并非与阻遏物接触,但其突变仍然极大地降低了与阻遏物的亲和力。这表明*操纵子呈现序列特异性构象以使其与阻遏物形成有利的接触*。可以想像,其他 DNA 序列也能呈现相同的构象,但太大的能量消耗使其很难与阻遏物形成稳定的复合物。这种由蛋白通过 DNA 骨架构象和(或)柔性识别 DNA 碱基序列的现象被称之为**间接识读**(indirect readout)。该发现改变了以前的观点,认为蛋白识别核酸序列需通过氨基酸侧链和核苷酸碱基之间形成类 Waston-Crick 碱基配对的特殊配对机制。

755

蛋氨酸阻遏物以双链 β 折叠与 DNA 结合

Simon Phillips 首先在缺乏 DNA 的情况下测定了大肠杆菌**蛋氨酸阻遏物**(met repressor)的 X 射线衍射结构,蛋氨酸阻遏物调节甲硫氨酸生物合成的基因转录。此同二聚体蛋白缺乏 HTH

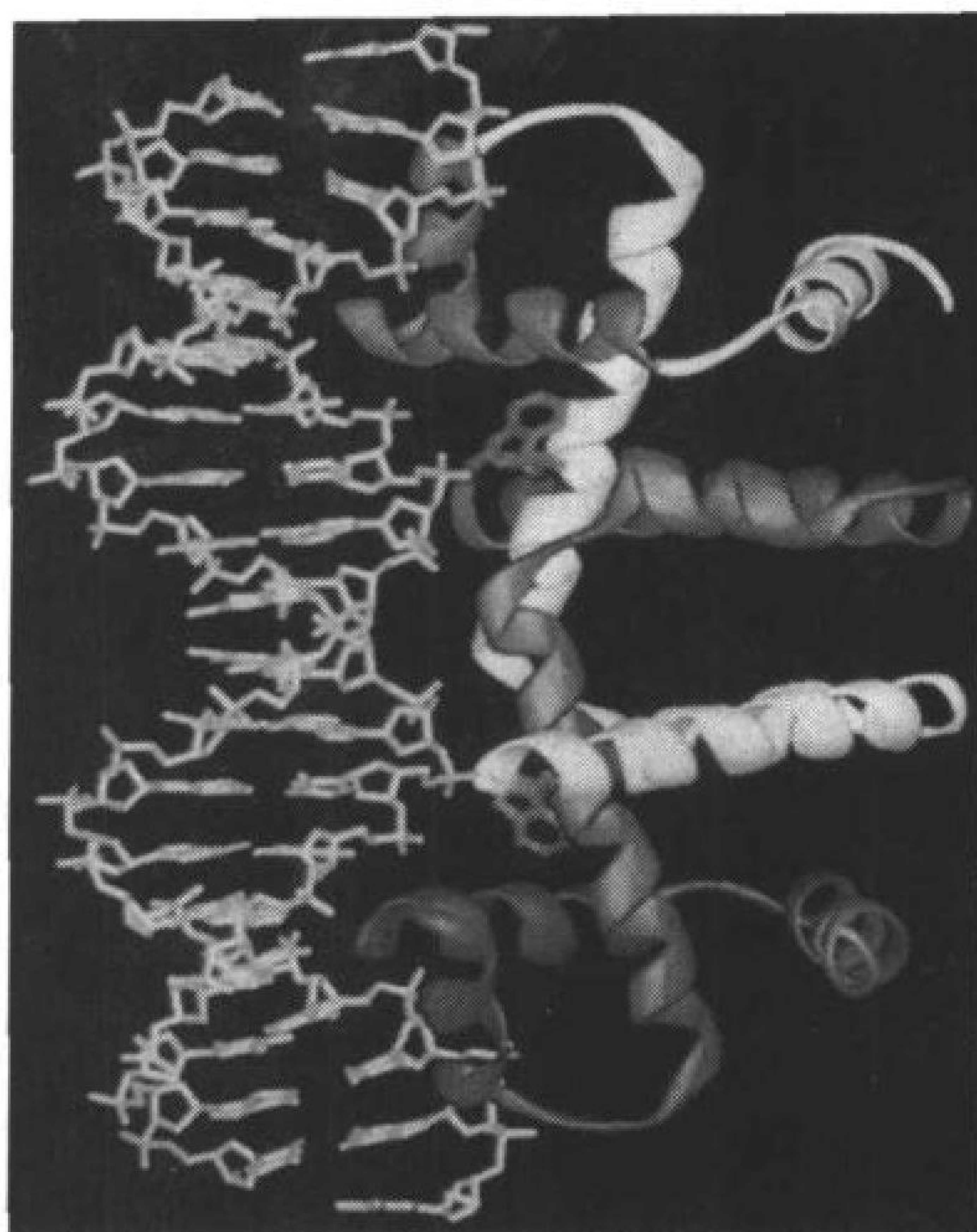


图 23-33 大肠杆菌色氨酸阻遏物-操纵子复合物 X 射线衍射结构

分子以二重轴水平放置并位于纸平面内。蛋白完全相同的两个亚基用飘带形式表示，它们分别用绿色和蓝色来表示，HTH 超二级结构用更深的颜色(深蓝和深绿)表示，18bp 自身互补 DNA 为黄色。仅当 L-色氨酸(红色)结合在 DNA 上时色氨酸阻遏物才与其操纵子结合。注意正如所料，在 DNA 连续的大沟中蛋白识别螺旋结合，但其延伸几乎垂直于 DNA 螺旋轴，然而，434 噬菌体阻遏物却是几乎平行于其结合的 DNA 大沟。

(引自 Yale 大学的 Paul Sigler 的 X 射线衍射结构)

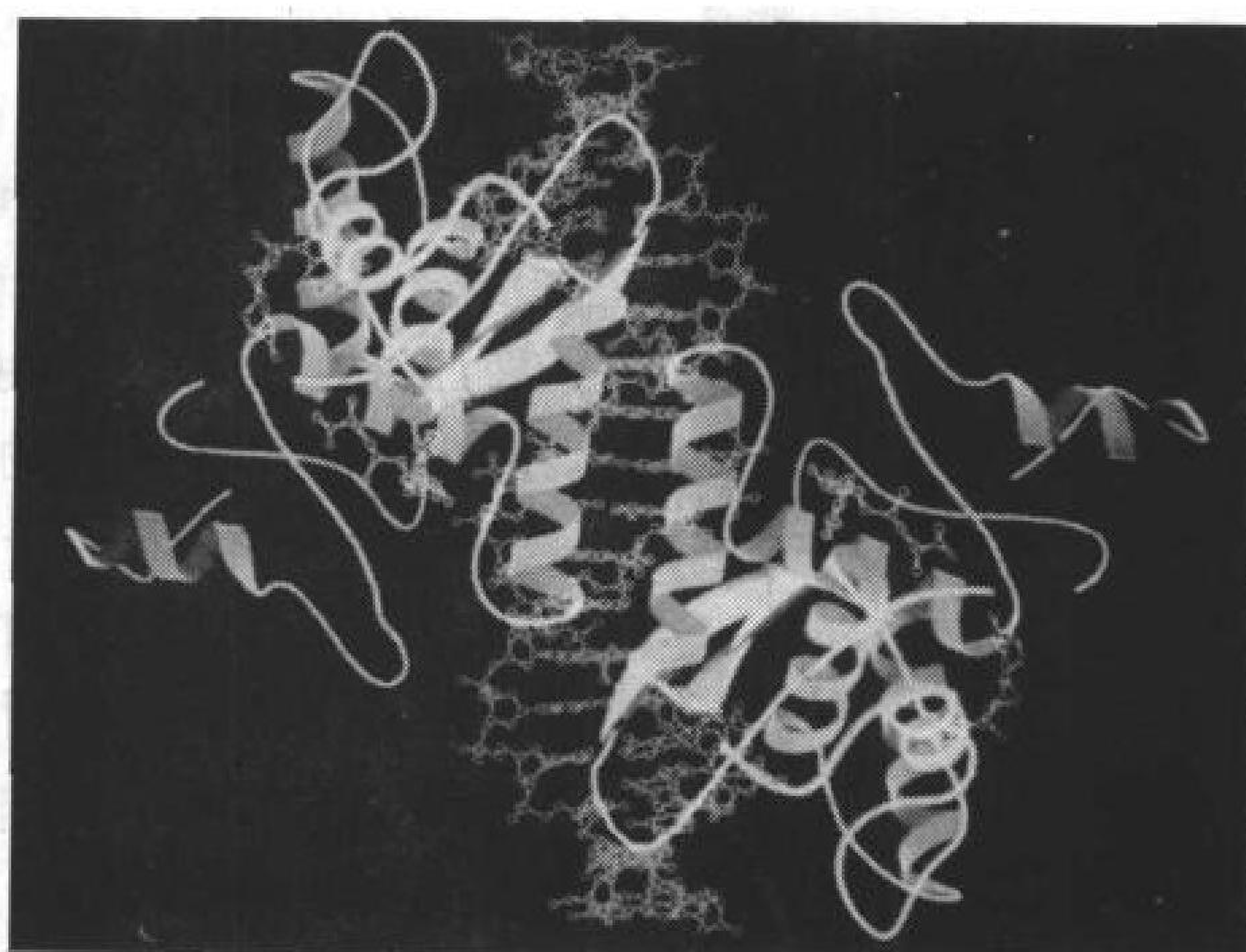


图 23-34 大肠杆菌蛋氨酸阻遏物-操纵子复合物 X 射线衍射结构

用金色表示 104 残基的阻遏物亚基。用蓝色球棍棒模型表示自身互补的 19bp DNA。用绿色表示的甲硫氨酸衍生的 S-腺苷甲硫氨酸必须结合到阻遏物上才能与 DNA 结合。注意 DNA 有 4 个结合的阻遏物亚基：一对对称二聚体亚基，其中每个亚基提供双链 β 折叠的一条链以插入到 DNA 的大沟中(左上和右下)。两个同样的二聚体通过它们的反平行 N 端螺旋横跨复合物的二重轴并与 DNA 的小沟接触。

超二级结构，但建模研究表明该阻遏物可能通过相关对称的前突 α-螺旋与其回文结构的靶 DNA 结合，其方式类比于 HTH 超二级结构识别螺旋与 DNA 相互作用的方式。然而，由测定蛋氨酸阻遏物-操纵子复合物的 X 射线衍射结构表明，蛋白实际上是通过一对相关对称 β 折叠（位于与前突 α-螺旋相对的蛋白另一侧）形成一段双链反平行 β 折叠插入到 DNA 的大沟 中，与其靶 DNA 序列结合（图 23-24）。β 链通过氢键结合和可能的间接识读与 DNA 特定序列结合，这个结果指出，即使看起来很明确的建模研究得到的结果也要用怀疑的眼光去看待。在蛋氨酸阻遏物-操纵子复合物的实例中，建模研究得到错误的模型是因为没有考虑蛋白和 DNA 在相互结合时构象上小的调整。

756

C. 真核生物转录因子

在真核生物中，基因在不同细胞类型中有选择地表达；这要求它比原核生物中有更复杂的调节机制。已知结构的原核生物阻遏物或者包含一个 HTH 超二级结构或者包含类似蛋氨酸阻遏物。然而，真核生物 DNA 结合蛋白采用更多的超二级结构结合到 DNA 上。许多被称之为**转录因子**（transcription factor）的蛋白（节 25-2C），通过结合到 DNA 序列或靠近这些基因序列来促进基因的转录。在本节中，我们将描述多种真核生物转录因子中的 DNA 结合超二级结构。

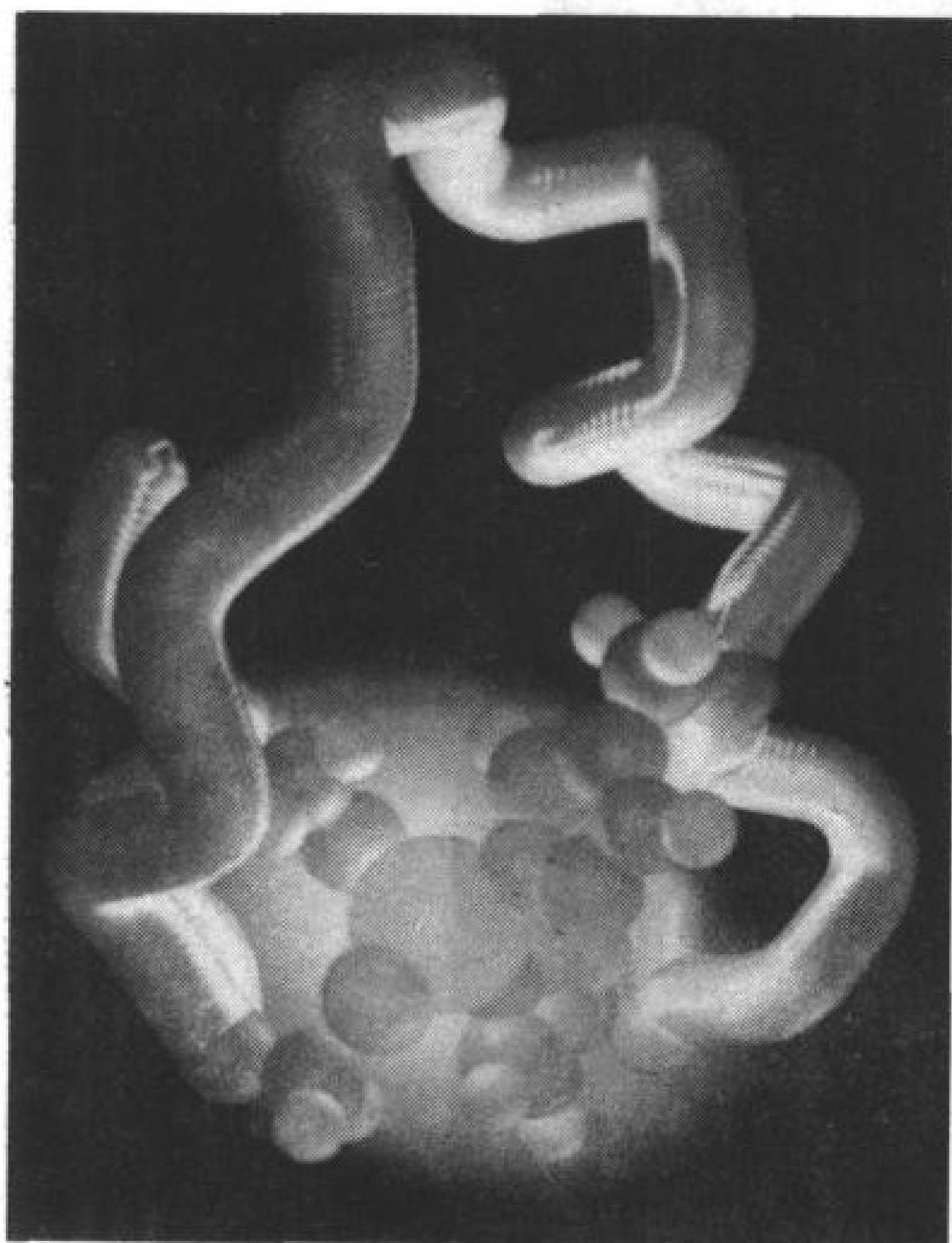


图 23-35 非洲蟾蜍蛋白 Xfin 中的锌指 NMR 结构 Zn^{2+} 与其 His 和 Cys 配位体原子用球形表示，Zn 为浅蓝色，C 为灰色，N 为蓝色，S 为黄色，H 为白色。（引自 Michael Pique, The Scrippes Research Institute, La Jolla, California. Based on an NMR structure by Peter E. Wright, The Scrippes Research Institute）

锌指 DNA 结合超二级结构

Aaron Klug 在从 *Xenopus laevis*（一种非洲有爪蟾蜍）得到的**转录因子 IIIA**（Transcription factor IIIA TFIIIA）中发现第一种主要的真核生物 DNA 结合超二级结构，**锌指**（zinc finger）。344 残基的 TFIIIA 包含 9 个相似、串联重复、约 30 个残基的模块，每一个都包含 2 个不变的 Cys 残基和 2 个不变的 His 残基。每一个单元均与 Zn^{2+} 结合，该离子与 Cys 和 His 残基成四面体配位（图 23-35）。在一些锌指中，与 Zn^{2+} 配位的两个 His 残基被 2 个额外的 Cys 残基所替代，也有的是 6 个 Cys 残基与 2 个 Zn^{2+} 配位。实际上，结构多样性正是锌指蛋白的标志。然而在所有情况中，Zn^{2+} 处在一个相对狭小的球形区域内，因此不需要更大的疏水蛋白核心（节 6-4A）。

Cys_2-His_2 锌指包含一个双链反平行 β 折叠和一个 α-螺旋（图 6-35 和图 23-35）。这类超二级结构中的 3 个结合在老鼠蛋白 **Zif268** 的一个 72 个残基的片段中，Carl Pabo 解析了 Zif268 与靶体 DNA 结合的复合物的 X 射线衍射结构（图 23-26）。3 个锌指排列成分离的区域，形成一个 C 形的与 DNA 的大沟紧密结合的结构。每一个锌指以构象相同的方式与连续的 3bp DNA 片段作用，这主要通过锌指 α 螺旋与 DNA 一条链之间的氢键起作用，每一个锌指以特异的氢键键合到大沟的两个碱基上。有趣的是，6 个缔合作

用中有 5 个涉及到 Arg-鸟嘌呤对。除了这些特定序列相互作用以外，每个锌指通过 Arg 和 His 残基与 DNA 磷酸基团氢键结合。 757

Cys_2-His_2 锌指类似于原核生物 HTH 超二级结构，也类似于我们碰到的大部分 DNA 结合超二级结构(包括其他类型的锌指)。所有这些 DNA 结合超二级结构为 α 螺旋插入到 B-DNA 的大沟中提供了一个平台。然而，与其他一些 DNA 结合超二级结构不同，Cys_2-His_2 锌指是作为与连续 DNA 片段接触的模块(一些转录因子含有高达 37 个锌指)，这样一个模块系统能识别广泛的不对称碱基序列。

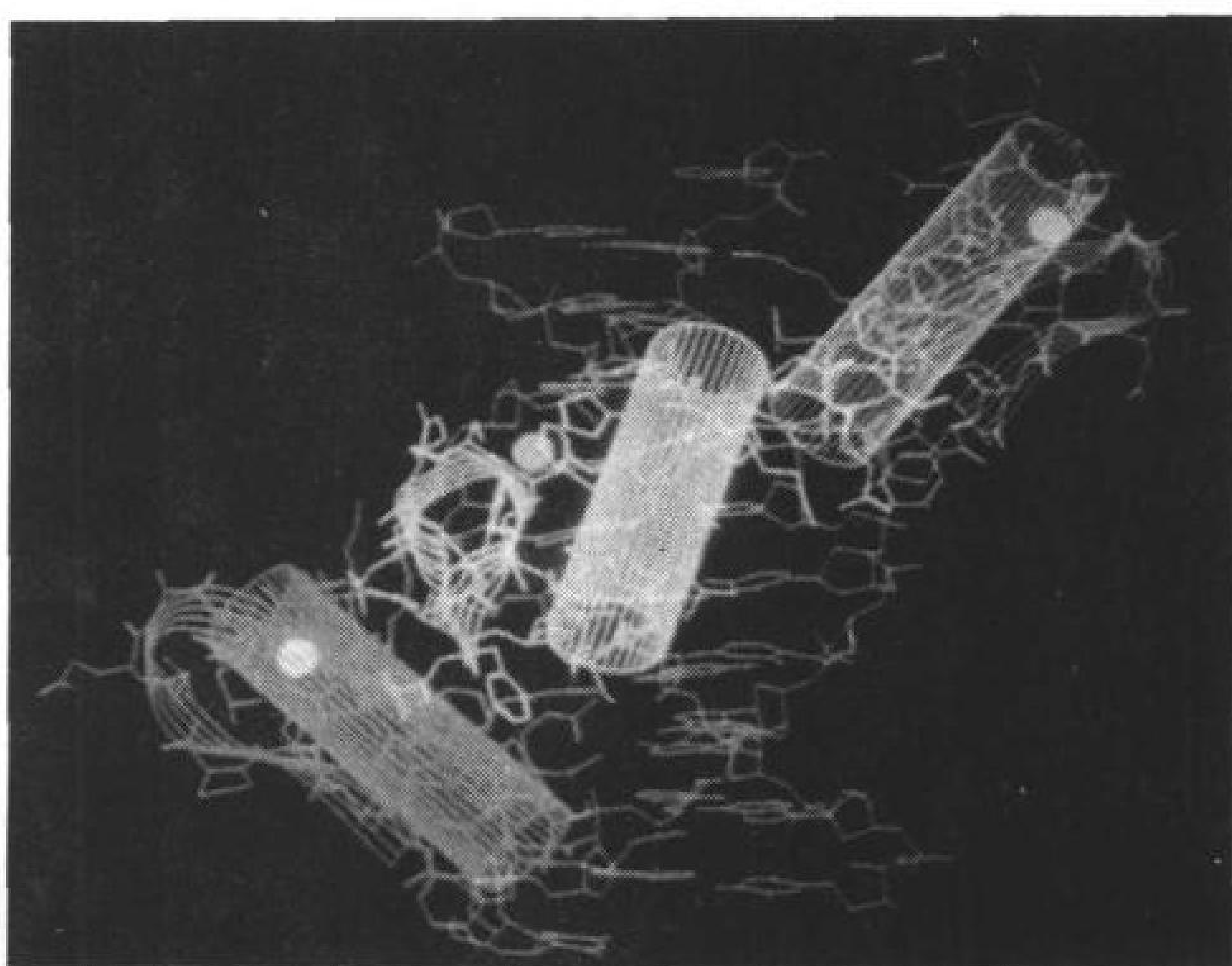


图 23-36　与 10bp DNA 结合的 Zif268 中 3 个锌指片段复合物的 X 射线衍射结构图

蛋白与 DNA(两端有一个单核苷酸突出)用棍棒图表示，蛋白的 α-螺旋和 β 折叠用附加的圆柱和飘带标识。指 1 为橙色，指 2 为黄色，指 3 为粉红色，DNA 为蓝色。Zn^{2+} 由青色球体表示。注意每个锌指螺旋的 N 端(低侧)是如何延伸到 DNA 的大沟中以接触到 3 个碱基对的。(引自 MIT 的 Carl Pabo)

一个双核 **Cys_6 锌指**作为 DNA 与酵母蛋白 **GAL4**——编码半乳糖代谢酶的几个基因的转录激活剂——结合的媒介。此 881 个残基蛋白的 N 端部分包含共同结合 2 个 Zn^{2+} 的 6 个 Cys 残基(图 23-27a)。每个 Zn^{2+} 与 4 个 Cys 残基形成四面体配位，其中 2 个残基与 2 个金属离子同时配位。GAL4 以对称二聚体结合到其 17bp 靶 DNA 上(图 23-37b)，而在缺乏 DNA 的情况下它为一个单聚体。每个亚基包括一个与 DNA 结合紧密的锌指(残基 8～40)，一个伸长的连接手臂(残基 41～49)和一个 α 螺旋(残基 50～64)，使 GAL4 二聚体化。锌指的 N 端螺旋插入到 DNA 大沟中，在每个识别序列末端使特异序列与高度保守的 CCG 序列接触，被结合的 DNA 仍然保持其 B 构象。

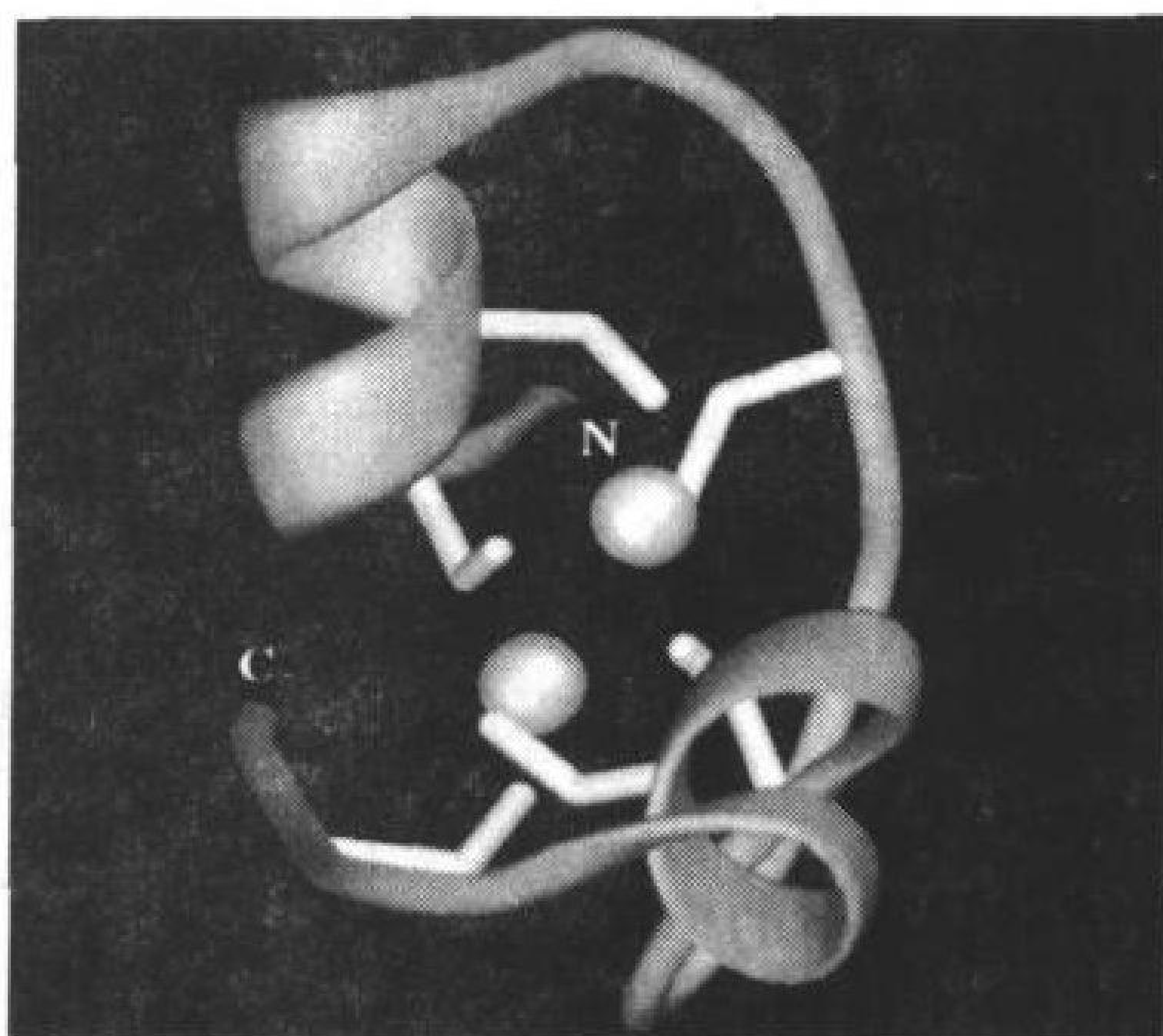
GAL4 的二聚体化螺旋(图 23-37b 的中心)位于 DNA 小沟的上方，连接这些螺旋和锌指的连接手臂沿其小沟缠绕着 DNA。两个对称的 DNA 结合锌指从 DNA 相对的两个方向接近大沟，相距约 1.5 个螺距，而如果从 DNA 的同侧方向接近大沟，就会像 HTH 超二级结构一样相距约 1 个螺距，所形成的相对开放的结构允许其他蛋白同时结合到 DNA 上。 758

具有亮氨酸拉链的转录因子

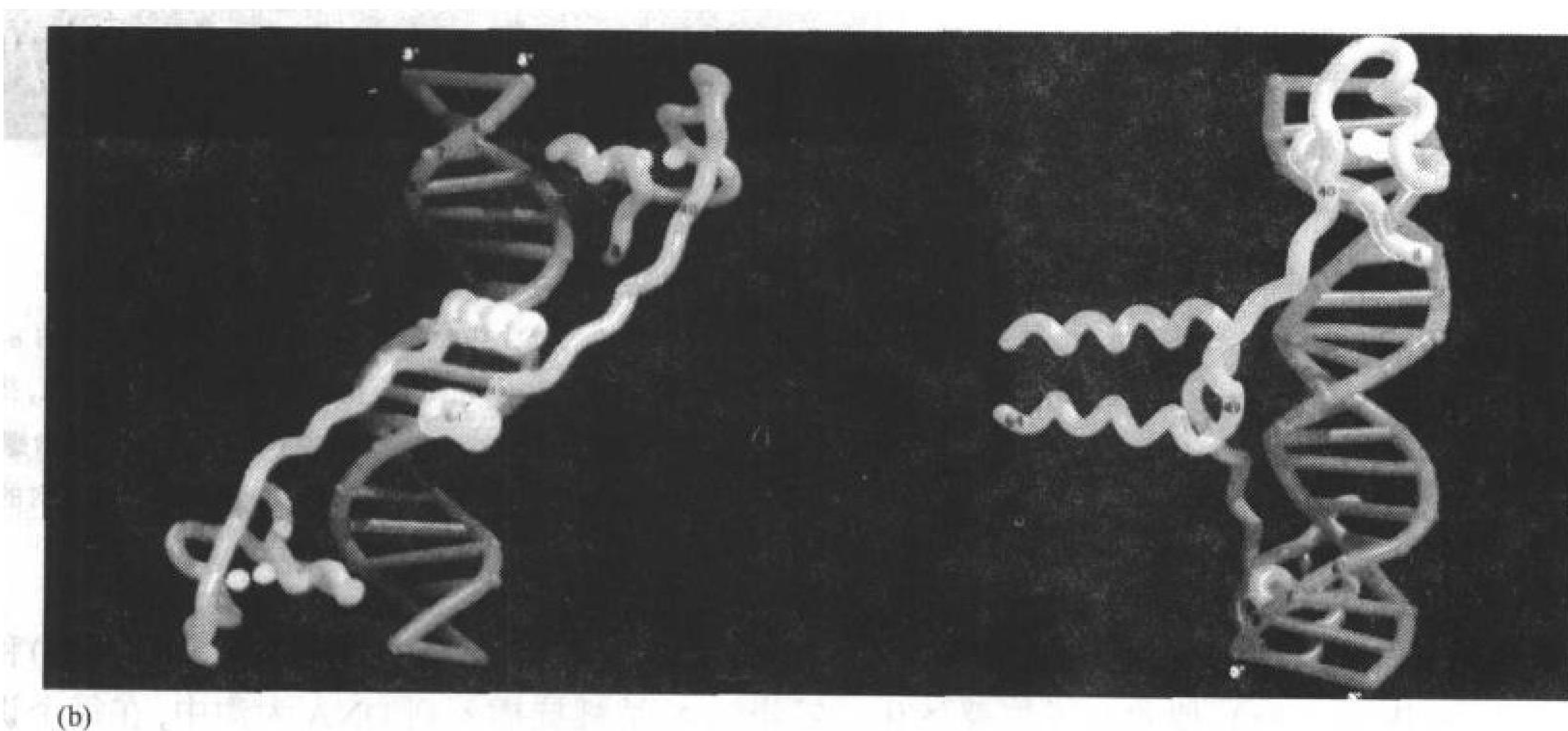
某些真核生物转录因子的片段，例如酵母蛋白 **GCN4**，在每 7 个位置上就有一个 Leu。已经看到，具有 7 个残基的假重复序列的 α 螺旋 $(a\text{-}b\text{-}c\text{-}d\text{-}e\text{-}f\text{-}g)_n$(其中 a 和 d 残基是疏水的)有一条疏水带使其二聚体化形成卷曲螺旋(例如，α-角蛋白，节 6-1C)。Steven McKnight 认为包含这样的**七重重复**(heptad repeat)结构的 DNA 结合蛋白同样形成一个 Leu 侧链犬牙交错的卷曲螺旋，就像拉链齿一样(图 23-38)。实际上，这些**亮氨酸拉链**(leucine zipper)调控某些 DNA 结合蛋白的二聚体化，但本身并不是 DNA 结合超二级结构。

图 23-37 GAL4 的 DNA 结合区与 DNA 的复合物的 X 射线衍射结构

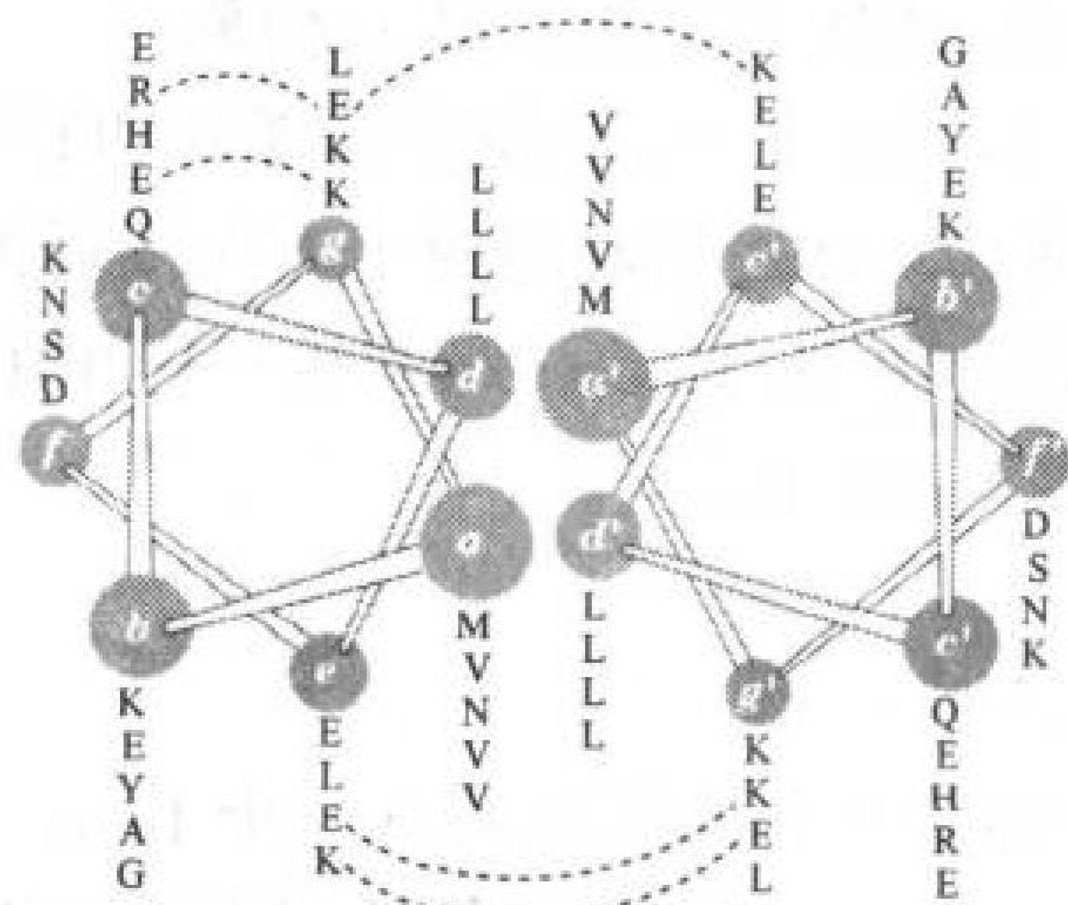
(a)蛋白锌指区域(残基 8～40)的飘带模型;其 6 个 Cys 侧链为棍棒形式(黄色),Zn^{2+}用银色球体表示。将该结构与图 6-35 或图 23-35 比较。(b)二聚体 GAL4 蛋白和含有蛋白结合序列的回文 19bp DNA(不包括中心碱基对)复合物结构图。其结构用管式图表示,DNA 为红色,蛋白骨架为青色,Zn^{2+}用黄色球体表示。左边的图是沿复合物二重轴来观看,而右边的图是将二重轴沿水平方向旋转 90°来观看的。请注意每个亚基的 N 端螺旋的 C 末端是如何延伸到 DNA 的大沟中的。(引自哈佛大学的 Mamorstein 和 Stephen Harrison)



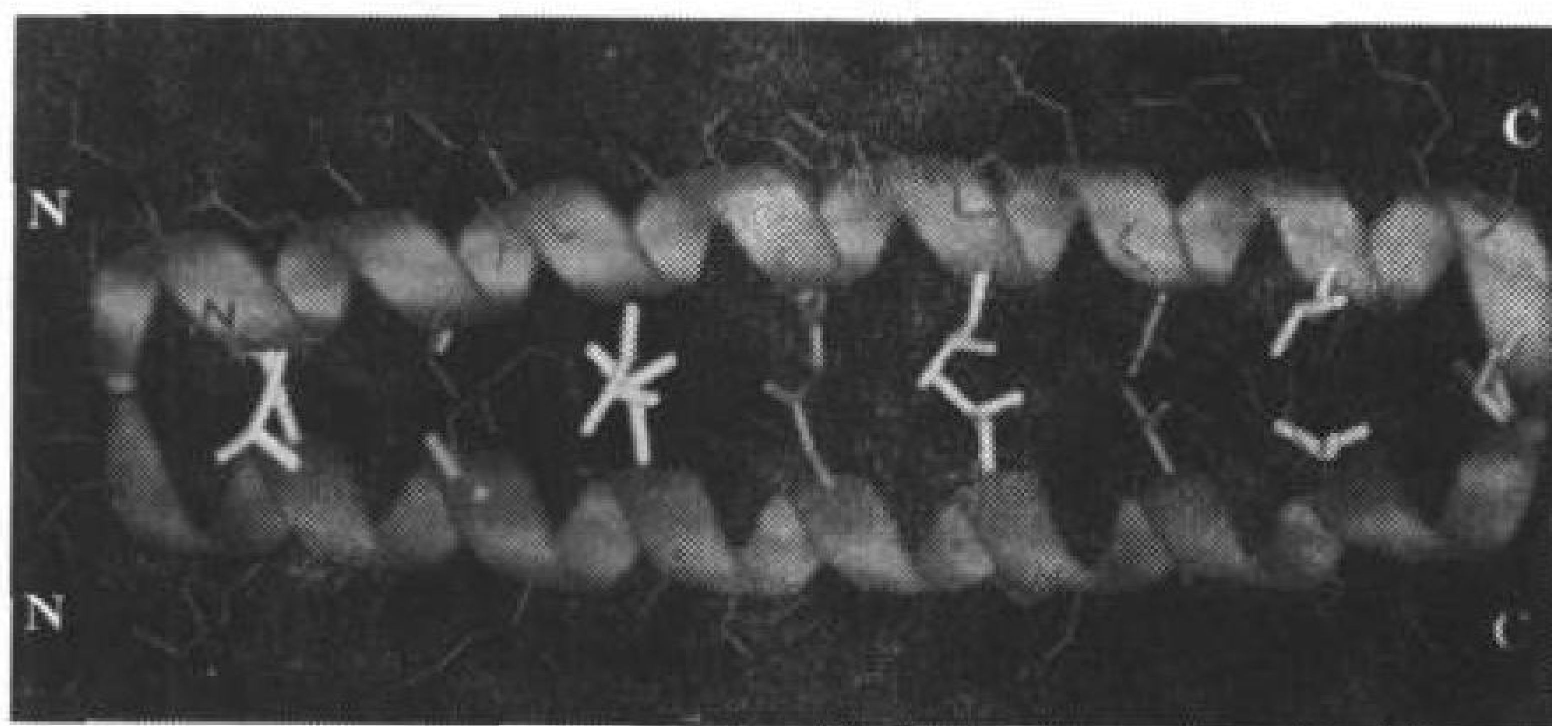
(a)



(b)



(a)



(b)

图 23-38 GCN4 亮氨酸拉链超二级结构

(a)从 N 端观察,一个螺旋圈代表了超二级结构的两个螺旋。每个位置的残基序列均用相邻一组单字母代号标识,在晶体结构中构成离子对的残基用虚线连接。注意位于 d 和 d'的残基是 Leu(L)。位于 a 和 a'的残基大部分是 Val(V),其他位置的残基大部分是极性的。[引自 O' Shea, E.K., Klemm, J.D., Kim, P.S. and Alber, T., Science 254, 540(1991)](b)从侧面观察的 X 衍射结构图,其中螺旋为飘带形式,侧链用棍棒图表示,d 和 d'处的 Leu 残基用黄色表示,a 和 a'处残基用绿色表示。[引自 Peter Kim 和 Thomas Alber(美国犹他医学院)的 X 射线衍射结构数据]

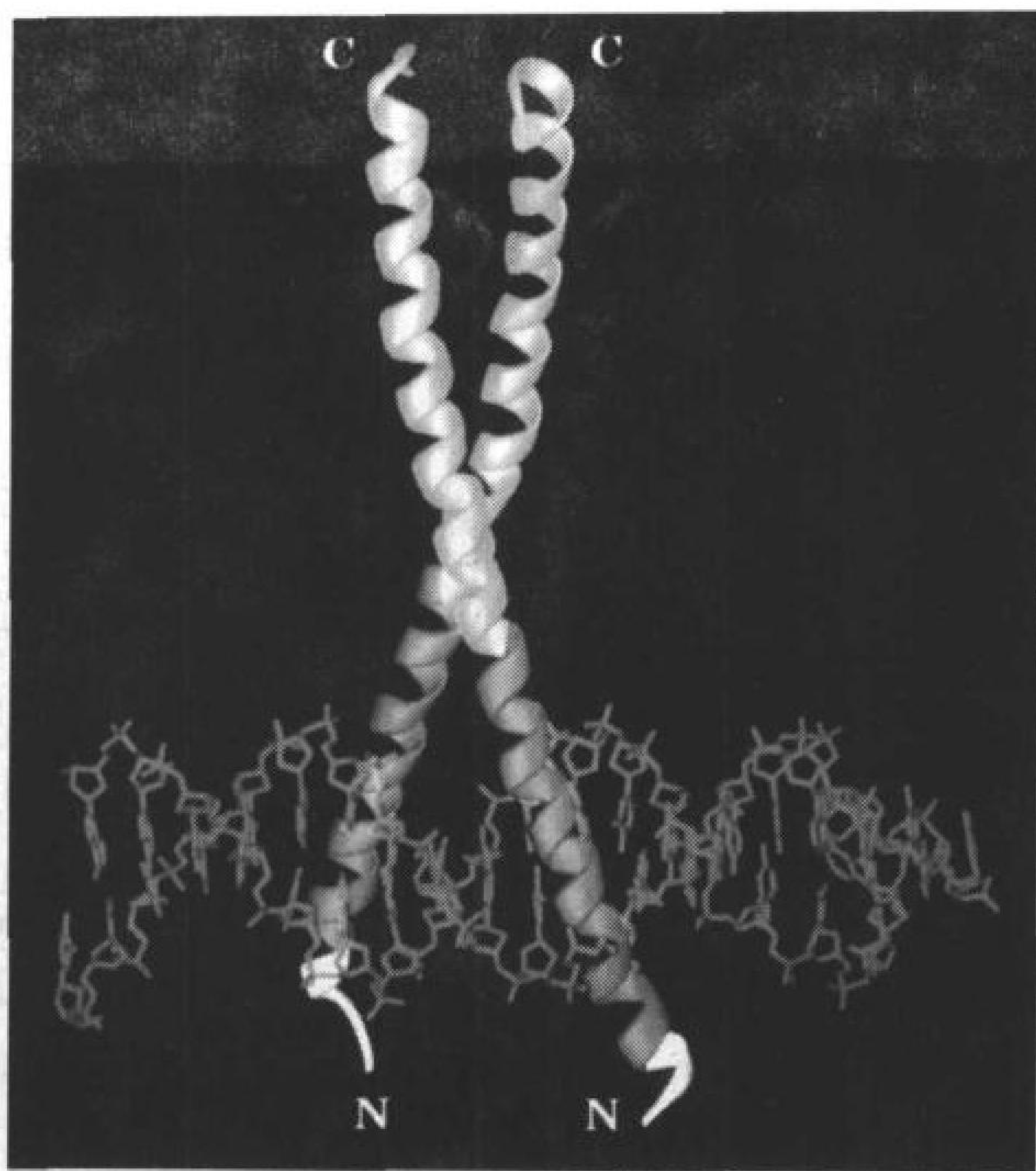


图 23-39 GCN4 部分与其靶 DNA 形成的复合物的 X 射线衍射结构

DNA 用棍棒图表示(红色),它由在每个末端的一个突出的单核苷酸的 19bp 片段组成;其中也包含蛋白的回文 7bp 靶序列(没有中心碱基对)。两个完全相同的 GCN4 亚基(用飘带形式表示)均含有一个 52 残基的 α 螺旋。在其 C 末端(黄色),两个亚基组合成一个平行卷曲螺旋(一个亮氨酸拉链),在其碱性区域(绿色),在靶序列的位置处它们平缓地叉开插入到 DNA 的大沟中。N 末端为白色。(引自哈佛大学的 Stephen Harrison 所作的 X 射线衍射结构)

Peter Kim 和 Thomas Alber 测定了对应于 GCN4 亮氨酸拉链的 33 个残基多肽的 X 射线衍射结构。前面的 30 个残基含有约 3.6 个七重重复单元,卷曲成约 8 圈 α 螺旋。正如 McKnight 所预测的,它以形成约 1/4 圈的平行左手卷曲螺旋的方式二聚体化,该二聚体就像一个扭曲的梯子,其侧链由螺旋骨架组成,其横挡由相互作用的疏水侧链构成。位于七重重复单元 d 位置的保守的 Leu 残基,对应于每第二个横挡,并非像 Mcknight 最初所设想的犬牙交错,而是边对边的接触。七重重复中 a 位残基(大多为 Val)构成交替的横挡,这些接触构成了两个螺旋间延伸的疏水界面。

759

在许多含亮氨酸拉链的蛋白中,富含碱性残基的 DNA 结合区域直接是亮氨酸拉链的 N 端。例如,在 GCN4 中,C 端 56 个残基构成一个延伸的 α 螺旋,这两个螺旋最后的 25 个残基联合组成亮氨酸拉链。螺旋的 N 端部分则平滑地分开结合到 DNA 相反一侧的大沟中,像剪子一样钳住 DNA(图 23-29)。GCN4 中这些部分的碱性残基,在不改变其构象的基础上与 DNA 靶序列的碱基和磷酸氧有大量的接触。

其他一些亮氨酸拉链蛋白质包含一个碱性区域,以形成**螺旋-环-螺旋(HLH)**超二级结构,这与一些原核生物 DNA 结合蛋白中螺旋-弯曲-螺旋超二级结构相类似。HLH 超二级结构第一个螺旋的 N 端部分(H1 螺旋)结合到其靶 DNA 的大沟中,HLH 超二级结构的 C 端螺旋(H2 螺旋)与一个亮氨酸拉链螺旋连续,形成一个卷曲螺旋。如图 23-40 所示的蛋白 **Max**,二聚体蛋白

从任何一侧抓住 DNA，每一个碱性区域都接触到 DNA 上的特定碱基和磷酸基团，环和 H2 螺旋的 N 末端的侧链同样也接触到 DNA 磷酸基团。

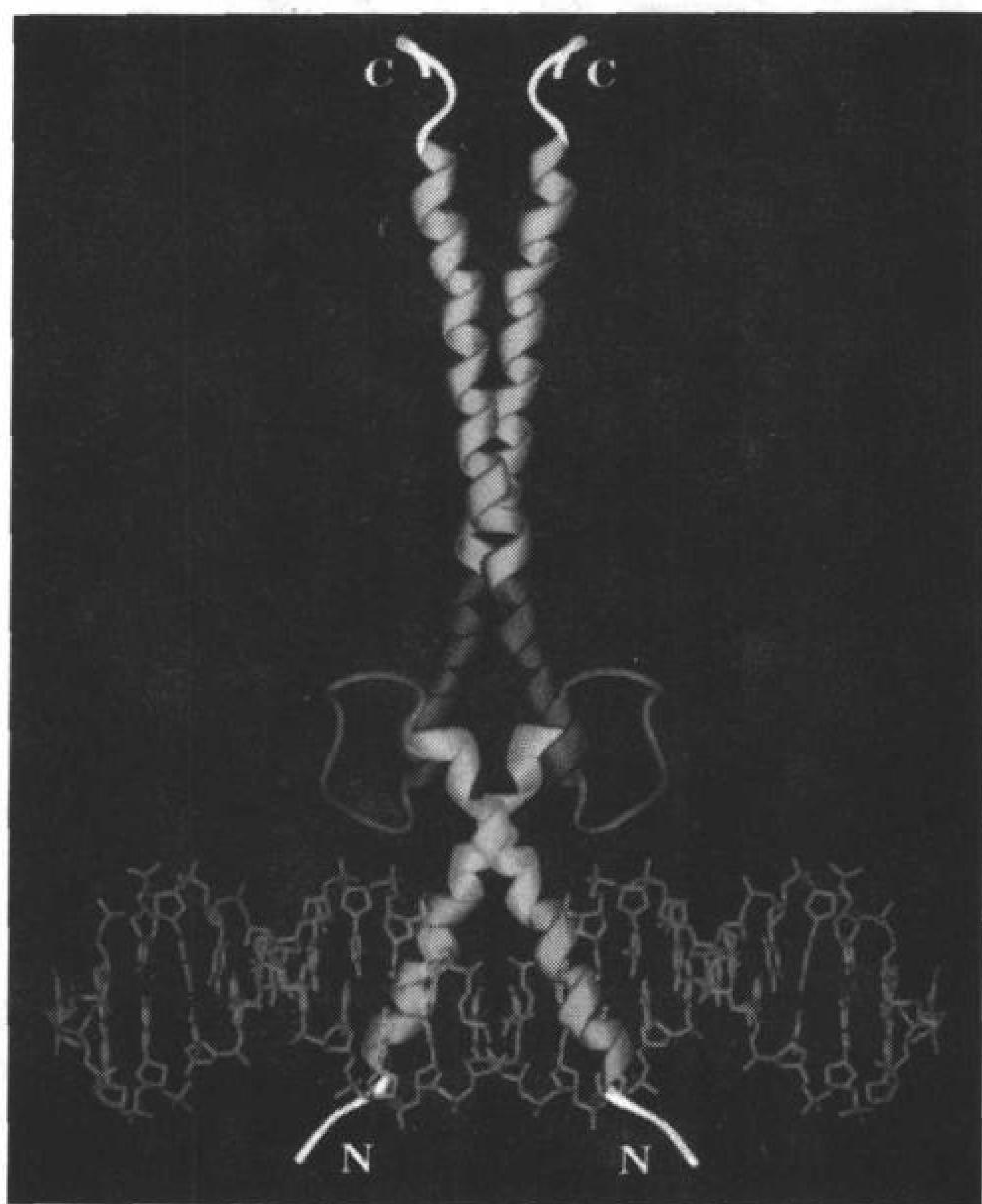


图 23-40 结合 DNA 的 Max 的 X 射线衍射结构

Max 二聚体中残基 22～113 与含有蛋白的回文 6bp 靶序列的 22bp DNA 形成复合物。DNA(红色)用棍棒图表示，同二聚体蛋白用飘带形式表示。蛋白的 N 端碱基区域(绿色)形成一个 α 螺旋，伸入到 DNA 大沟中与其靶序列作用，随后与螺旋-环-螺旋超二级结构的 H1 螺旋(黄色)平滑融合。在环(洋红色)之后，蛋白中 HLH 的两个 H2 螺旋(紫色)与亮氨酸拉链螺旋(灰色)平缓融合形成一平行卷曲螺旋。蛋白的 N 末端和 C 末端均为白色。(引自 Rockefeller 大学的 Stephen Burley 所测定的 X 射线衍射结构)

760

5 真核生物染色体结构

DNA 分子通常都非常巨大(图 23-41)。虽然 B-DNA 的每个碱基仅仅为其**表观长度**(contour length，完全伸展的天然分子由头到尾的长度)贡献约 3.4Å。一个包含 166kb 的 DNA 分子(例如，T2 噬菌体 DNA)长 55μm。含有 30 亿碱基对的人类基因组的 23 对染色体其总体表观长度约 1m。分子生物学中的老问题之一是：当如此巨大数量的基因信息仅仅存贮在细胞内一个小小的体积中，它是如何能在一段合理的时间里被扫描和解码。

直径仅为 20Å 的伸长双链 DNA 及其相对的刚性在细胞保护环境以外时容易受到机械损伤。例如，果蝇染色体，如果延展 50 万倍，其形状和机械性质将类似于一条 6km 长的生意大利面条。实际上，通过搅动、振荡或者移取 DNA 溶液使 DNA **切断降解**(shear degradation)是制备

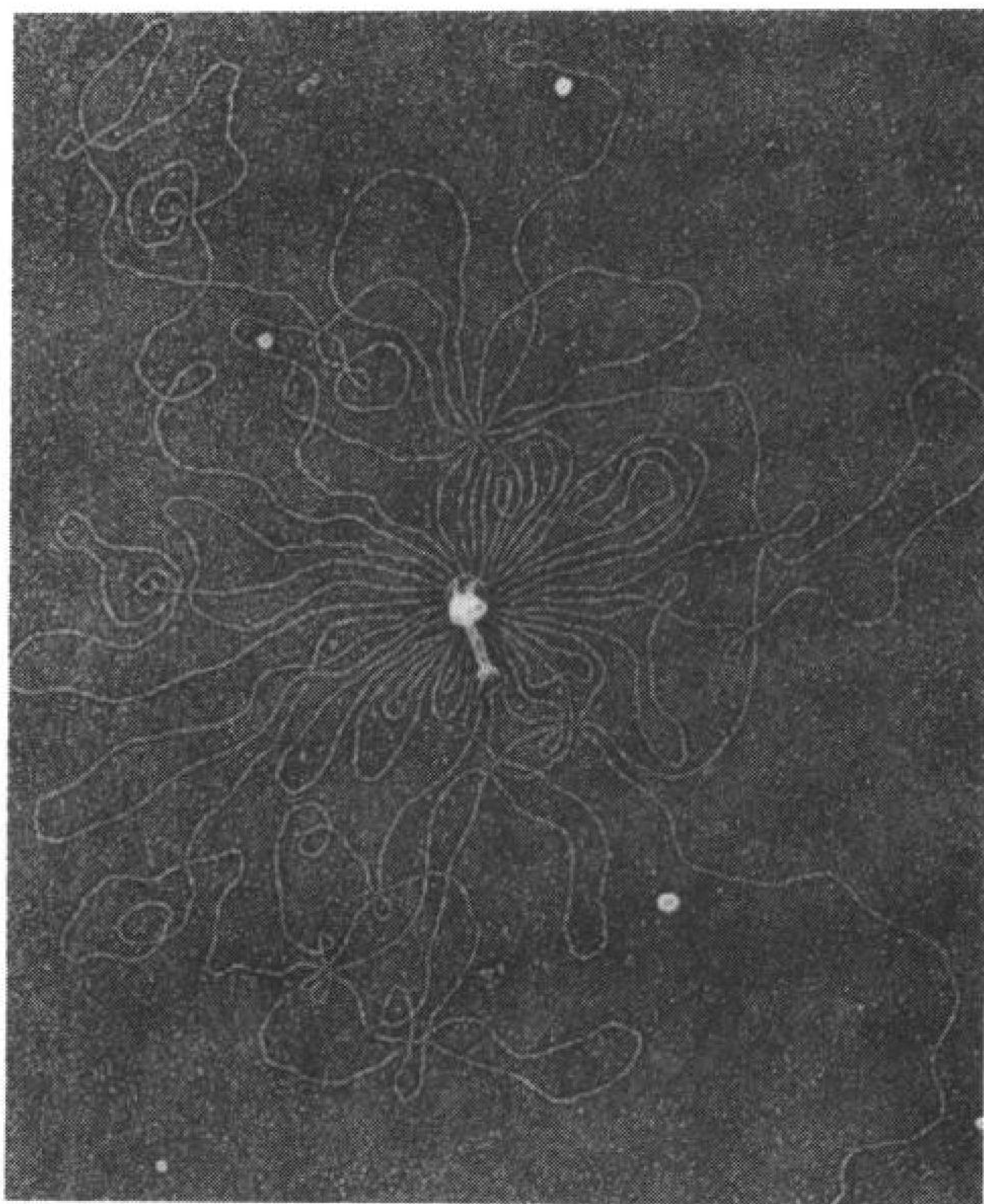


图 23-41　T2 噬菌体及其 DNA 的电镜图

噬菌体在蒸馏水中渗透胞解，其 DNA 向外溢出。为了使 DNA 在电镜上可视，首先用变性细胞色素 c 覆盖其上使其直径增大到约 200Å，然后用铂使组合物变暗。[引自 Kleinschmidt, A. K., Lang, D., Jacherts, D., and Zahn, R. K., Biochim. Biophys. Acta 61, 861(1962)]

DNA 片段的标准实验室方法。

原核生物基因组通常含有一个单环 DNA 分子。然而，大多数真核生物将其基因组压缩包裹在几个**染色体**(chromosome)中。每个染色体是一个单链线性 DNA 分子和蛋白的复合体，是被称之为**染色质**(chromatin)一类的物质，其外形随**细胞周期**(cell cycle)而发生很大的变化，细胞周期是指发生在真核生物细胞存活期间事件进程的通常顺序。例如，染色体仅仅在细胞分裂中期呈现其最紧密的形式(图 23-42)。在细胞循环的其他期间，当 DNA 被转录和复制时，尽管这些染色体的 DNA 仍处于 B-螺旋形式，但大多数细胞的染色体变得非常的分散，以至于不能加以区别。人类染色体轮廓长度有 1.6～8.2cm，但其最紧密状态仅为 1.3～10μm 长。在本节中，我们研究 DNA 在细胞中是如何包裹到如此压缩的程度。

761

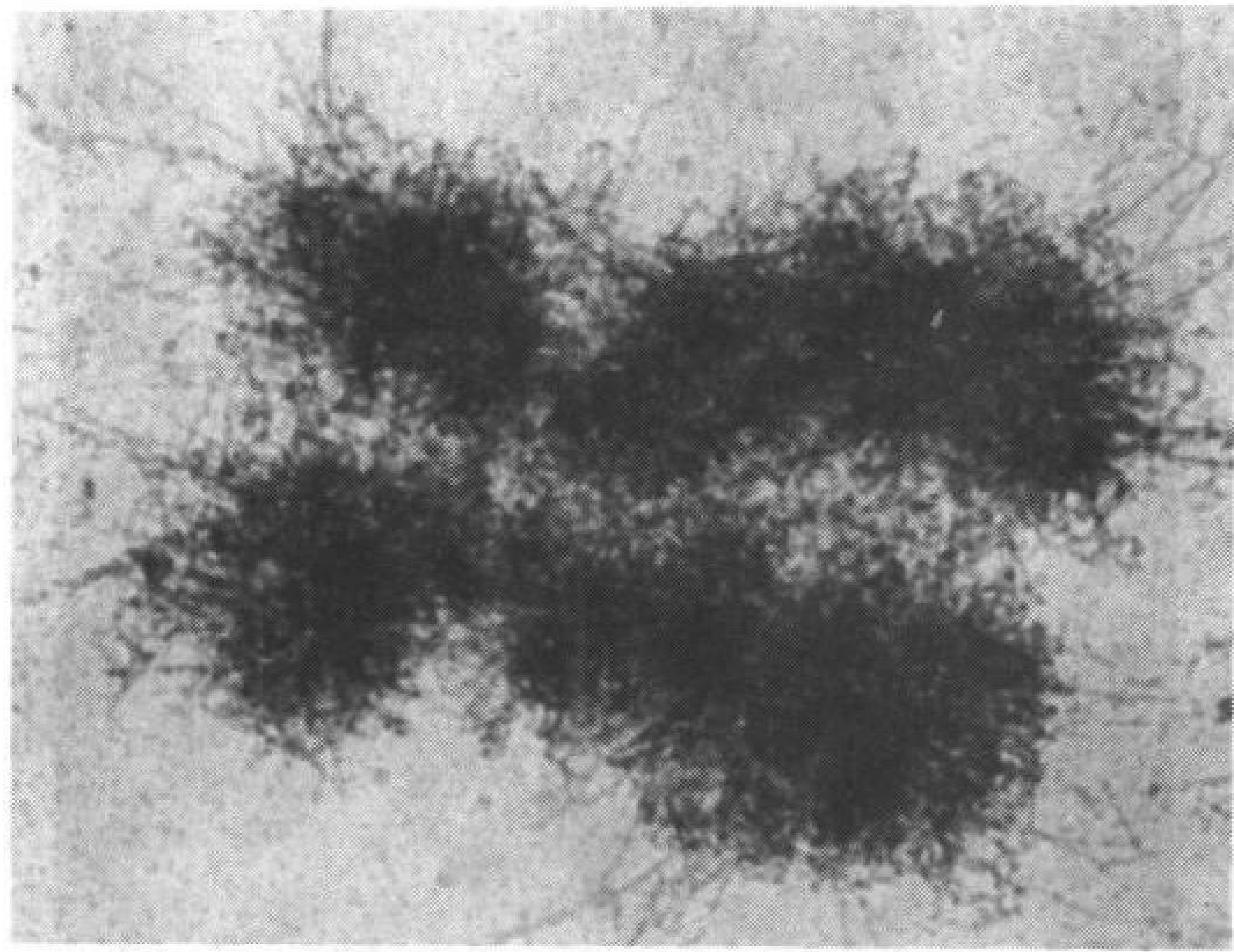


图 23-42 人的细胞中期染色体的电镜图
(引自武装部队的病理学研究所的 Gunther Bahr)

A. 组蛋白

染色质中有一半是蛋白质(按质量),这些蛋白质的大多数为**组蛋白**(histone)。为了弄清楚DNA是如何被包裹的,我们必须首先研究这些蛋白质。5类主要的组蛋白,H1、H2A、H2B、H3、H4,均有一个很大比例的正电荷残基(Arg 和 Lys;表 23-3)。因此这些蛋白质可以通过静电作用与DNA的带负电荷的磷酸基团结合。

表 23-3 小牛胸腺组蛋白

组蛋白	残基数	分子质量/kDa	% Arg	% Lys
H1	215	23.0	1	29
H2A	129	14.0	9	11
H2B	125	13.8	6	16
H3	135	15.3	13	10
H4	102	11.3	14	11

组蛋白 H2A、H2B、H3 和 H4 的氨基酸序列是十分保守的。例如,来自母牛和豌豆的组蛋白H4仅仅只有2个残基的差别,而母牛和豌豆是十二亿年以前就分岔的物种,这使组蛋白成为已知蛋白进化中保留最完整的蛋白(节 5-4A)。如此的进化保守性暗示组蛋白行使着重要的功能,以至于其结构是如此的和谐而不允许发生改变。第五种蛋白 H1,与其他组蛋白相比容易发生改变;随后我们将会看到它扮演着稍微不同的角色。

组蛋白经受翻译后修饰,其中包括特定 Arg、His、Lys、Ser 和 Thr 残基的甲基化、乙酰化和磷

酸化。这些大多为可逆的修饰，均减少了组蛋白的正电荷，因此显著改变了组蛋白-DNA 相互作用。尽管组蛋白具有很好的进化保守性，它们的修饰程度仍随物种、组织和细胞循环阶段不同而有明显差别。正如我们看到的（节 27-3A），组蛋白的修饰与转录活性相联系。这些修饰可能在组蛋白自身或它们所结合的 DNA 上产生了新的蛋白结合位点。

B. 核小体

1974 年，Roger Kornberg 以如下几条证据指出染色质组成的第一个层次：

1）染色质含有大致相同数目的组蛋白 H2A、H2B、H3、H4，并最多含有一半数目的组蛋白 H1；

2）低离子强度下制备的染色质的电镜图显示为直径约 100Å 的质点，这些质点由清晰可见的裸露 DNA 细链连接起来，就像一串珠子一样（图 23-43）；

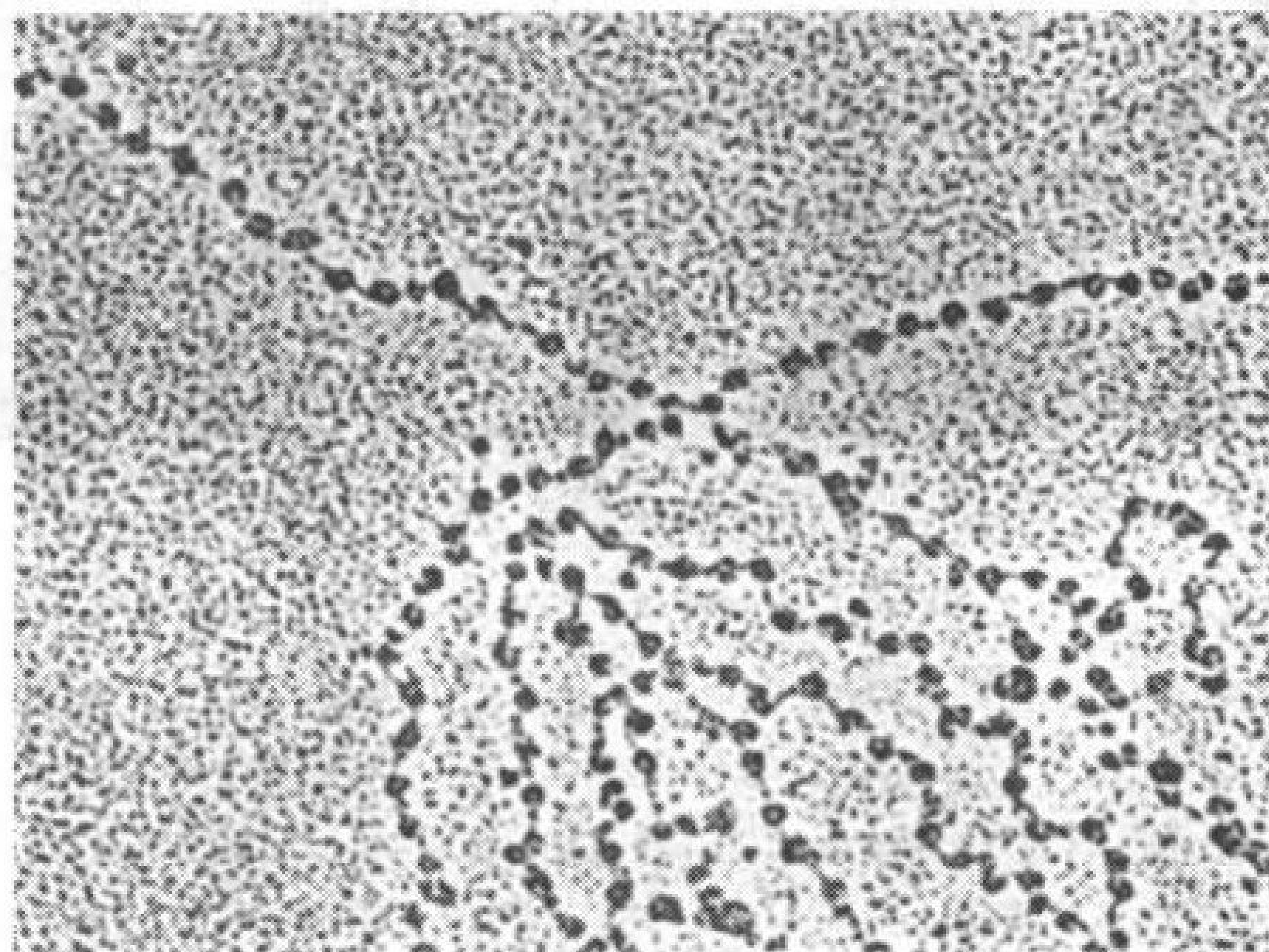


图 23-43　*D. Melanogaster* 染色质电镜图显示接近分离的核小体串
（引自 Virginia 大学的 Oscar L. Miller, Jr 和 Steven Mcknight）

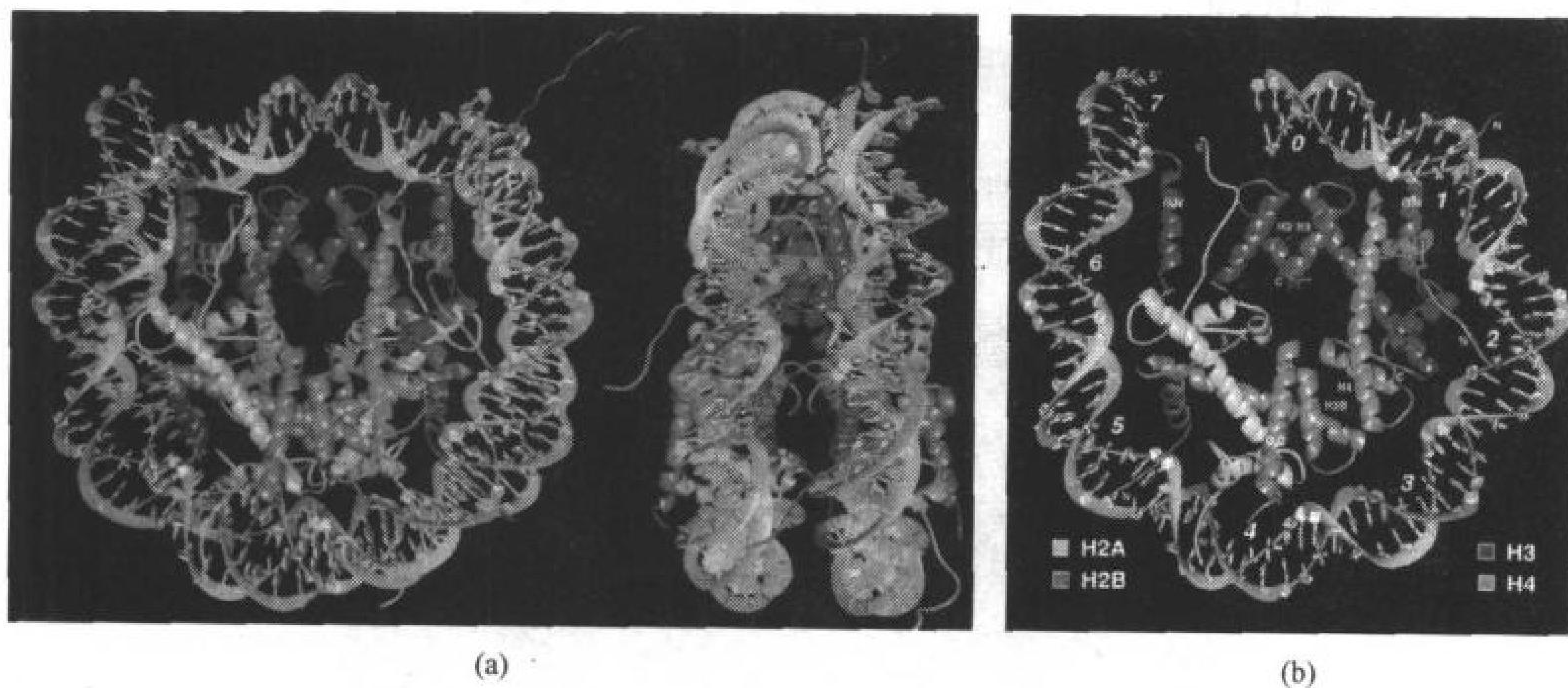
3）主要消化染色质的**微球菌核酸酶**（micrococcal nuclease，水解双链 DNA）仅仅在上述各个粒子间切断 DNA；显然这些粒子紧紧跟 DNA 结合在一起以保护 DNA 免受核酸酶的分解。凝胶电泳显示每个粒子含有约 200bp 的 DNA，Kornberg 将这些染色质粒子称之为**核小体**（nucleosome），由与约 200bp DNA 结合在一起的 $(H2A)_2(H2B)_2(H3)_2(H4)_2$ 八聚体组成。第五个组蛋白 H1，假定以其他一些方式与核小体结合（详细见下面的叙述）。

DNA 盘绕在组蛋白八聚体上构成核小体核心粒子

微球菌核酸酶最初降解染色质形成单一核小体和组蛋白 H1 的复合物。进一步分解以去除附属的 DNA，释放出组蛋白 H1。该过程去掉了所谓的**核小体核心粒子**（nucleosome core partide）——由与组蛋白八聚体结合的 146bp DNA 链构成。用核酸酶拆解下来的一段**连接 DNA**（linker DNA），将相邻的核小体连接起来。在不同生物和组织中，其长度在 8～114bp 间变化，平均长度为约 55bp。

Timothy Richmond 测定核小体核心粒子的 X 射线衍射结构，该结构显示一个接近二重对称

结构的复合物，其中 B-DNA 以 1.65 圈的左手超螺旋环绕组蛋白八聚体的外侧旋转(图 23-44a)。尽管其序列只有很少的类似，但这 4 种组蛋白仍具有相似的折叠，其中一个长中心螺旋的每侧与一个环和一个短螺旋相接(图 23-44b)。每对组蛋白如“分子握手”似的犬牙交错形成月牙形杂交二聚体 H2A-H2B 和 H3-H4，2.5 圈双链 DNA 以 140°的弯曲结合到每一个二聚体上。通过两个 H3 组蛋白的 4 个螺旋形成一束，使每个 H3-H4 对相互作用形成$(H3\text{-}H4)_2$四聚体，通过 H2A 和 H4 间的类似四螺旋束，H2A-H2B 与之相互作用形成八聚体(图 23-44b)。



(a) (b)

图 23-44 核小体核心粒子的 X 射线衍射结构

(a)沿超螺旋轴(左)和垂直轴旋转 90°后(右)观察整个核心粒子。组蛋白八聚体用飘带形式表示，H3 为蓝色，H4 为绿色，H2A 为黄色，H2B 为红色。146bp DNA 的糖-磷酸骨架用棕色和绿松石色飘带表示，其碱基用相同颜色的多边形表示。在两个视图中，假二重折叠轴垂直从顶部穿过 DNA 中心。(b)图 a 中左图所示为核小体核心粒子的上半部分，用相同颜色表示。内部的数字 1 到 7 标出了 73bp DNA 超螺旋顺序排列的双螺旋圈数的位置。整体绘出的组蛋白主要是与这个 DNA 片段结合的，仅表示出来自该粒子另一半的 H3 和 H2B 的片段，用 H3′H3 和 H2BH4 标出两个四螺旋束。(引自 Timothy Richmond, Eidgenössische Technische Hochschule, Switzerland)

蛋白主要通过糖-磷酸骨架的氢键、盐桥、螺旋偶极(它们的正电荷 N 端)，这些都与磷酸基上的氧相互作用，以及通过脱氧核糖环的疏水相互作用结合到 DNA 上。此外，在面向组蛋白八聚体一边的所有 14 个位置中都有一个 Arg 侧链嵌入到 DNA 的小沟中。DNA 超螺旋的直径为 42Å，孔径为 24Å。然而，DNA 并非是标准的超螺旋形式，而是因组蛋白核心的凸出而在一些特定位置急剧地弯折。此外，DNA 双螺旋沿着其长度呈现出显著的构象变化，例如对比 DNA 在溶液中的 10.4bp/转，其螺旋每圈就从 9.4bp 变到 10.9bp，平均为 10.2bp/转。

763

连接组蛋白将核小体连接在一起

在微球菌核酸酶分解染色质纤维的过程中，约 200bp DNA 首先降解为 166bp。然后在组蛋白 H1 被释放、DNA 被进一步降解到 146bp 前有一个停顿，因为核心粒子的 146bp DNA 产生 1.65 圈的超螺旋，166bp 中间体将形成约两整圈超螺旋以使其头尾相接。Klug 提出组蛋白 H1 在该点与核小体 DNA 结合，在该点 DNA 片段进入和离开核心粒子(图 23-45)。含有 H1 的染色质纤维紧密隔开核小体(图 23-46a)，DNA 进入和离开核小体均在同一侧。在减少 H1 的染色质

764

中，进入点和离开点在核小体的不同侧发生，从而形成更分散的排列(图 23-46b)。很显然，这些

连接组蛋白在压缩染色质纤维和调节其他蛋白接近DNA方面起着相当积极的作用。

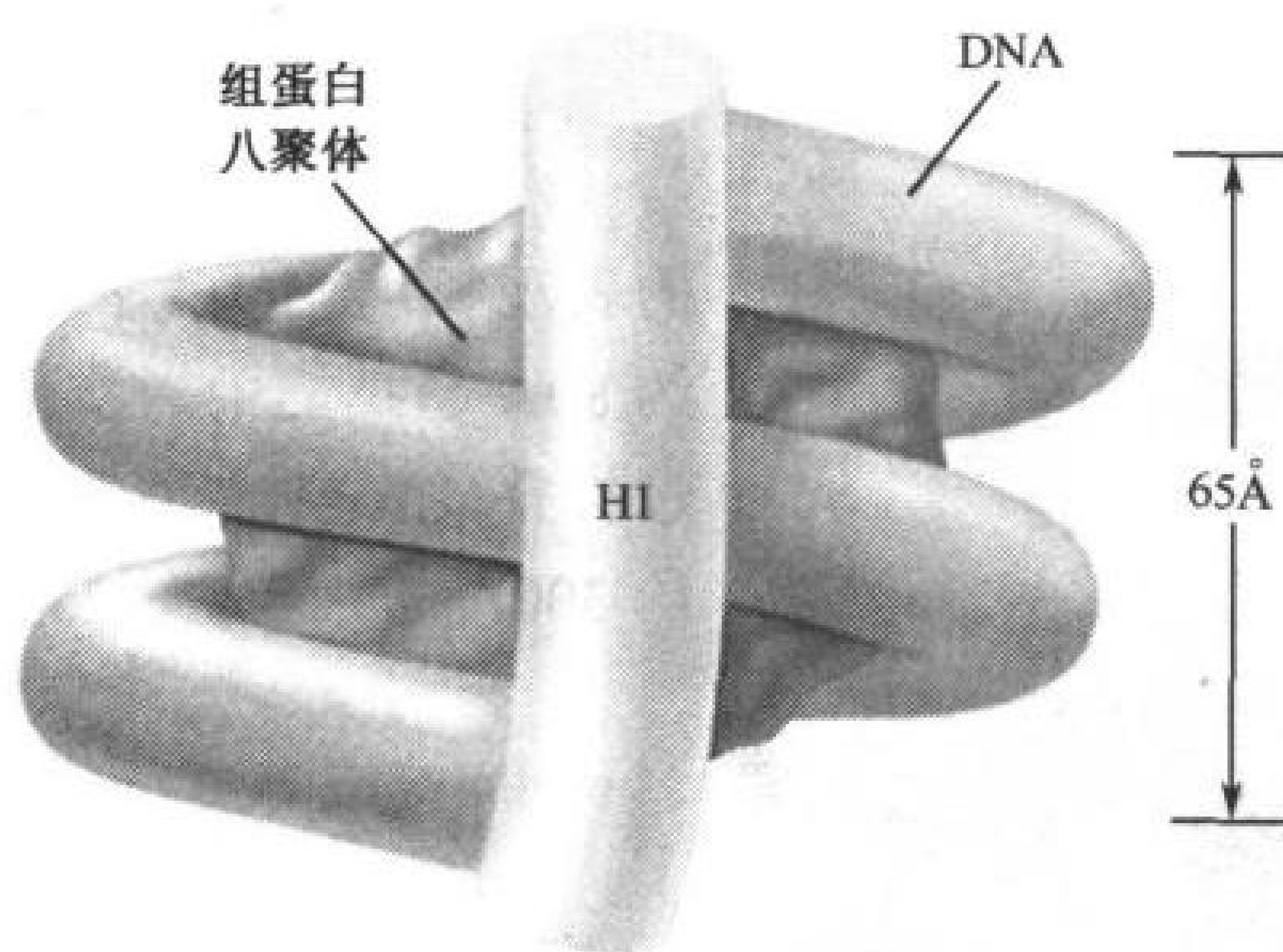


图23-45 组蛋白H1与核小体166bp DNA结合的模型

DNA的两个完全超螺旋圈使H1结合DNA的头尾和中部成为可能。

图中组蛋白八聚体用中心球体表示,H1分子用黄色柱体表示。

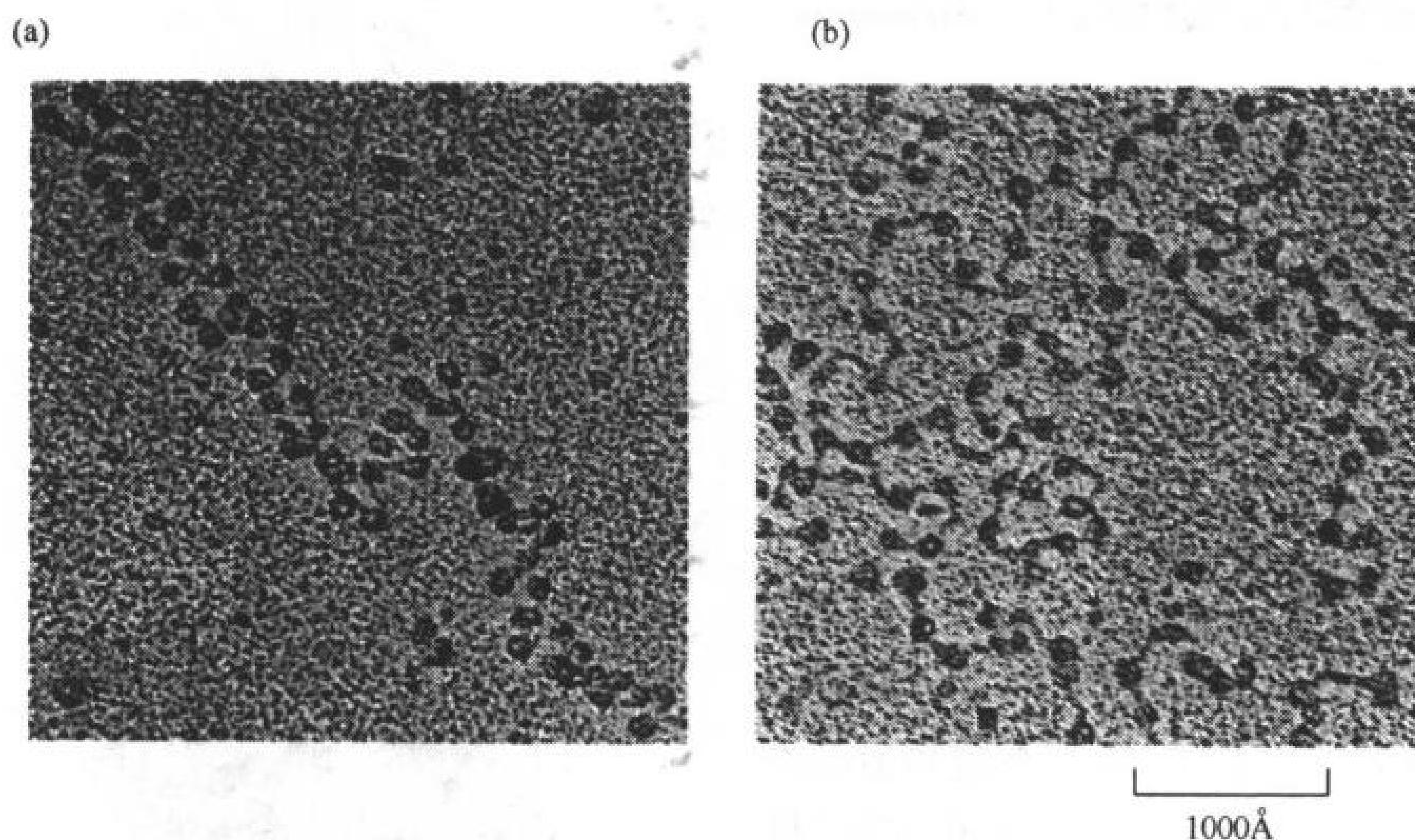


图23-46 染色质电镜图

在5~15 mmol/L盐溶液中含H1蛋白(a)和缺乏H1蛋白(b)的情形。(引自Fritz Thoma, Eidgenössische Technische Hochschule, Switzerland)

C. 染色质结构的更高层次

DNA 螺旋环绕在核小体上减小了 7 倍的表观长度：560Å 长度的 166 bp 被压缩到约 80Å 超螺旋中。在生理盐水中，染色质通过折叠成“之”字型进一步压缩以形成直径约 300Å 的细丝（图 23-47）。

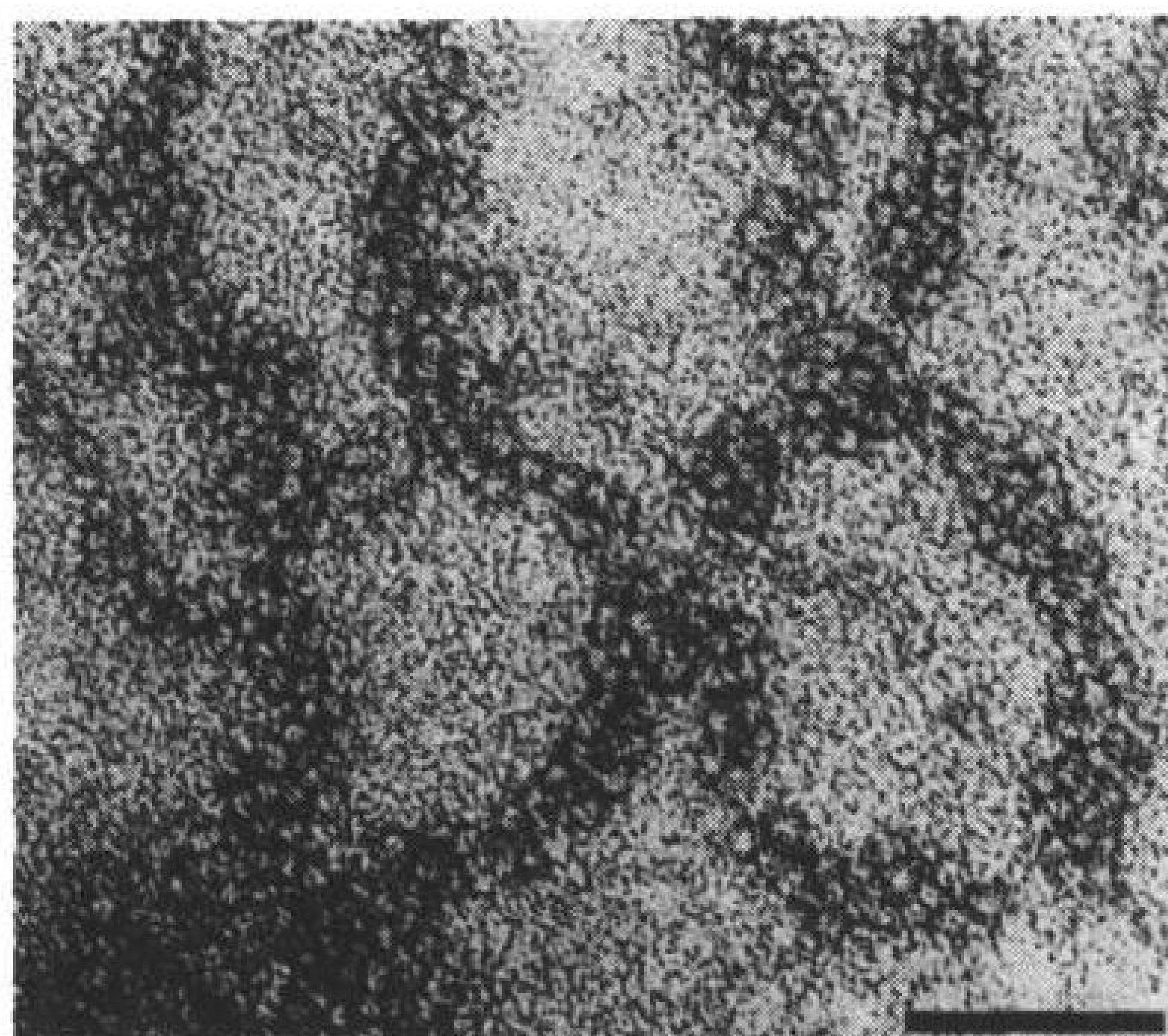


图 23-47　染色质细丝的电镜图
注意该 300Å 细丝是 2～3 个核小体交叉的结果。

765

建模研究表明这些细丝是一个每圈约 6 个核小体、孔径为 110Å（核小体的直径）的螺线管（图 23-48）。螺线管通过相邻的核小体中的 H1 组蛋白分子之间的相互作用而得以稳定。实验证据表明螺线管模型在活体内只能是近似的，因为核小体核心粒子间连接 DNA 长度的变化而使 300Å 的细丝具有非组织、不规则的结构。例如，将一个碱基加在连接 DNA 上，引起了核小体在每端有 36°的相对旋转。非组蛋白 DNA 结合蛋白也可以干扰核小体的正常的包裹。如此非正常的压缩结构暗示，一个特定 DNA 序列的可接近性并不依赖于其在具有相同结构细丝中的位置，而是染色质压缩程度的一种功能，可能转而在序列依赖性形式上发生变化。

在核小体的 X 射线衍射结构中，组蛋白 H2B 和 H3 的 N 端尾部在 DNA 超螺旋的回转之间穿越（图 23-44a）。这些尾部的 N 端片段是强碱性的并含有组蛋白的乙酰化位点，

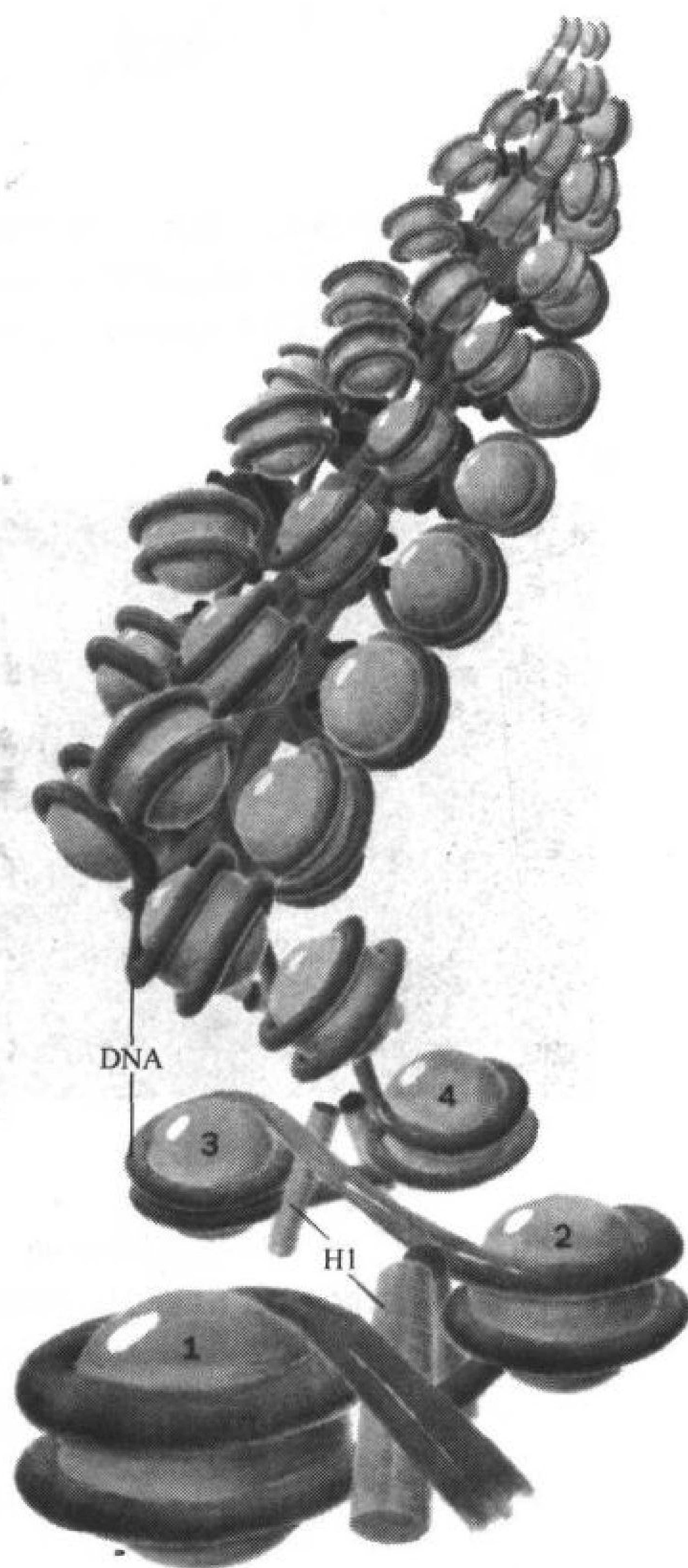


图 23-48　300Å 染色质细丝的推测模型
核小体（1、2、3、4）间的“之”字型形状近似形成一个螺线管，每圈有 6 个核小体。在这个模型中，H1 分子（黄色）位于螺线管的中心。

因此通过它们与邻近核小体的相互作用稳定染色质丝的形成。此外，在核小体的 X 射线衍射结构中，在一种延展构象中，一个 H4 的正电荷 N 端尾部结合到来自于邻近核小体的 H2A-H2B 二聚体暴露面上的一个强负电荷区域。H4 N 端尾部的乙酰化减小了其正电荷，因此减弱了这种相互作用。由于组蛋白尾部含有大量的乙酰化位点，染色质的高级结构的崩溃，至少部分是由某些残基的乙酰化而不是由其他所控制的。

DNA 环结合在脚手架上

缺乏组蛋白的中期染色体呈现出一个由大量的 DNA 晕轮(halo)包围的中心纤维蛋白“脚手架(scaffold)”(图 23-49a)。这些 DNA 束形成的许多环在几乎同一点进出脚手架(图 23-49b)。大多数的环有 15～30μm 长(相当于 45～90kb)，所以当压缩至 300Å 细丝时，它们只有约 0.6μm 长。如图 23-50a，染色体横截面电镜图有力地证明中期染色体的染色质丝是径向排列的。如果观察到的环对应于这些径向纤维，那么它们对染色体的直径贡献为 0.3μm(纤维必须回绕以形成环)。考虑脚手架 0.4μm 的宽度，这个模型预测中期染色体的直径应为 1.0μm，这与观察结果相吻合(图 23-50b)。一个典型的人染色体通常含有约 1 亿 4 千万 bp，因此有约 2000 个这样的约 70kb 径向环。这样一个染色体的 0.4μm 直径的脚手架有足够的表面沿其 6μm 长来结合如此数量的径向环，因此该径向环模型可以解释 DNA 在中期染色体中所观察到的包裹率。　767

对 300Å 细丝是如何形成径向环，或中期染色体和非分裂细胞的许多分散染色体是如何互变的，依然知之甚少。当然，在这样的过程中必然涉及构成染色体蛋白的 10% 的非组蛋白的蛋白质。　768

在原核生物中，DNA 同样通过与类似组蛋白功能的强碱性蛋白质缔合进行包裹，类核小体

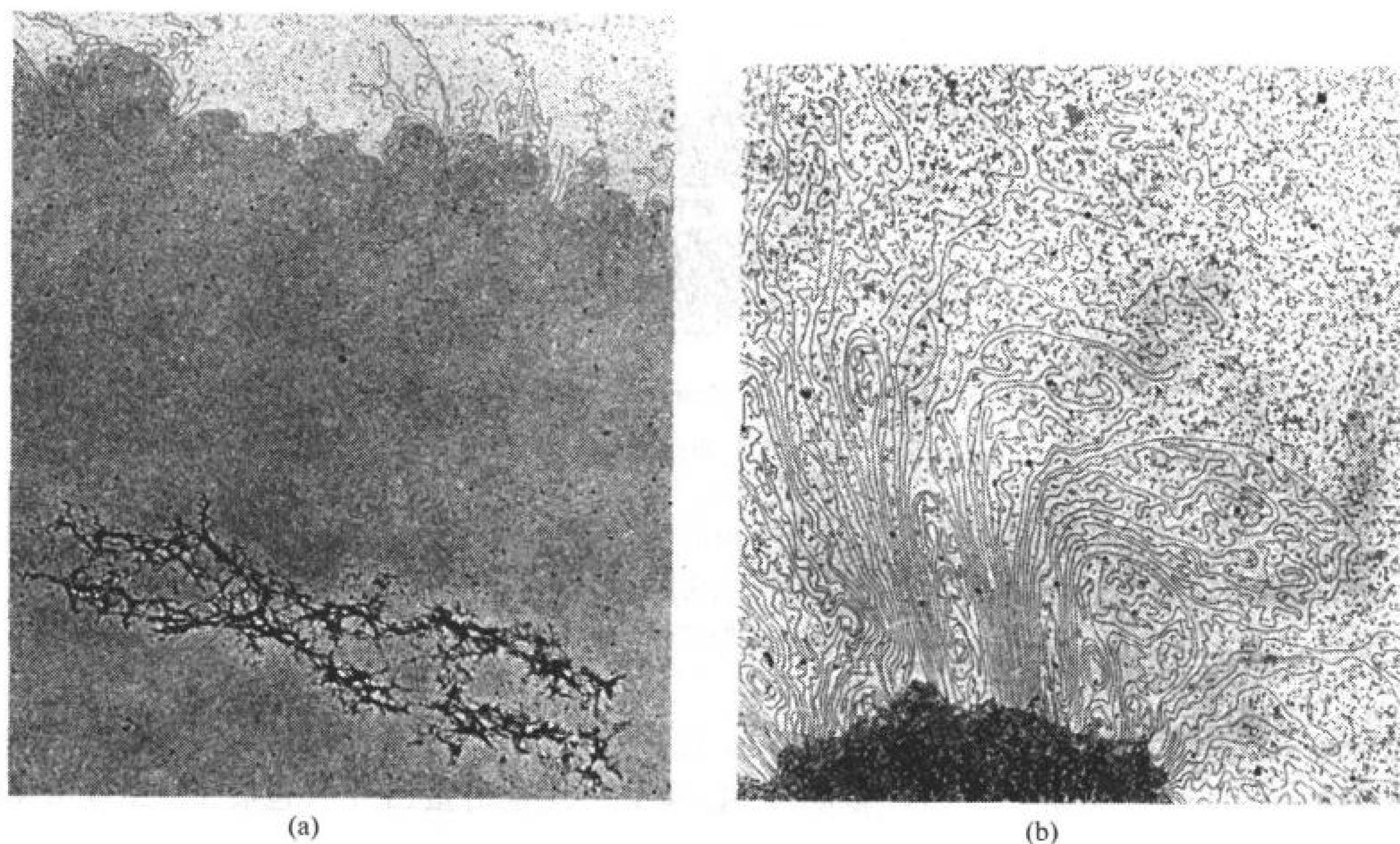


图 23-49　缺乏组蛋白的人类中期染色体的电镜图

(a)中心蛋白基质(脚手架)固定四周 DNA。(b)高倍放大显示 DNA 以环的形式结合到脚手架上。

(引自瑞士 Geneva 大学 Ulrich Laemmli)

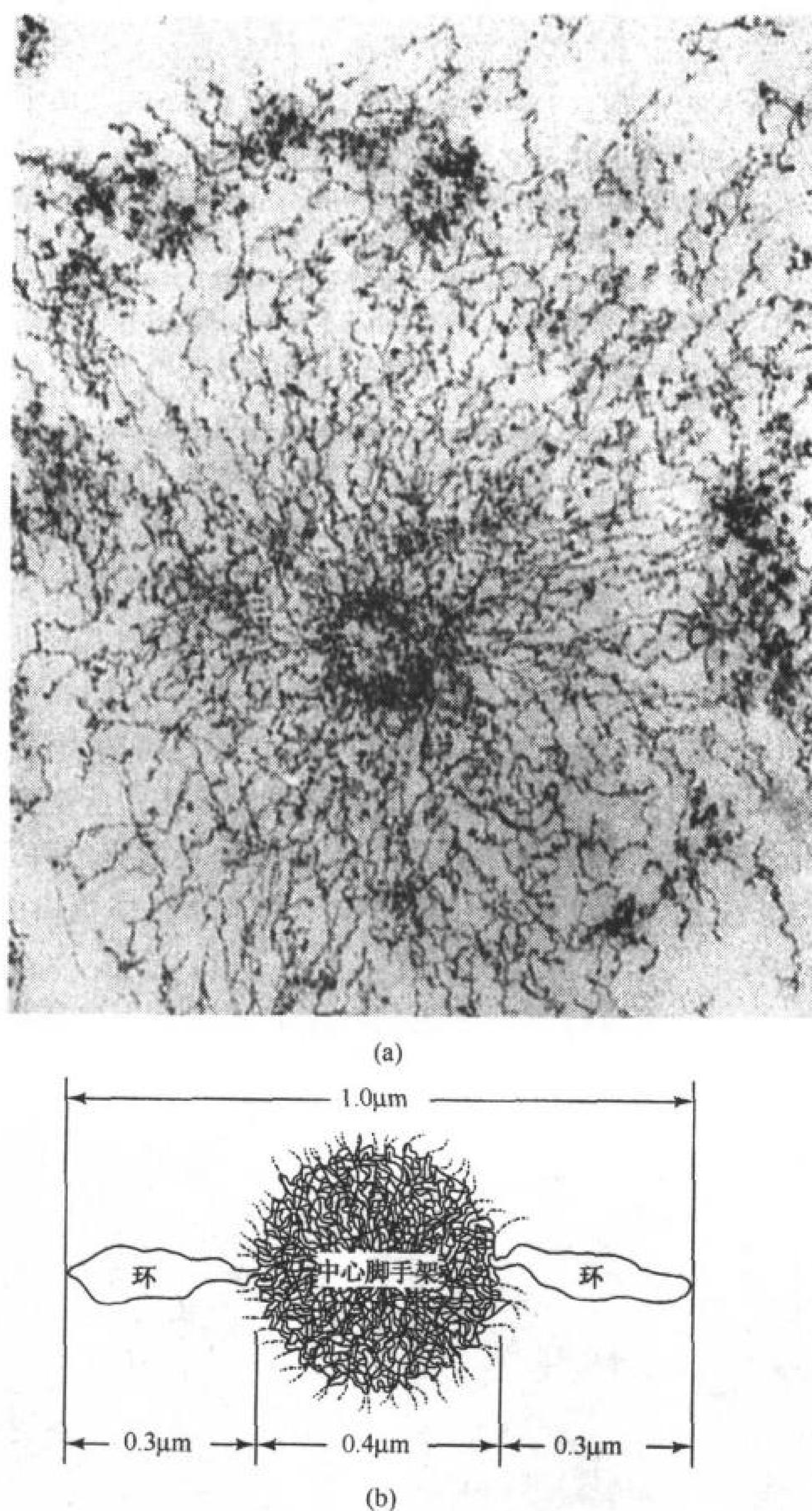


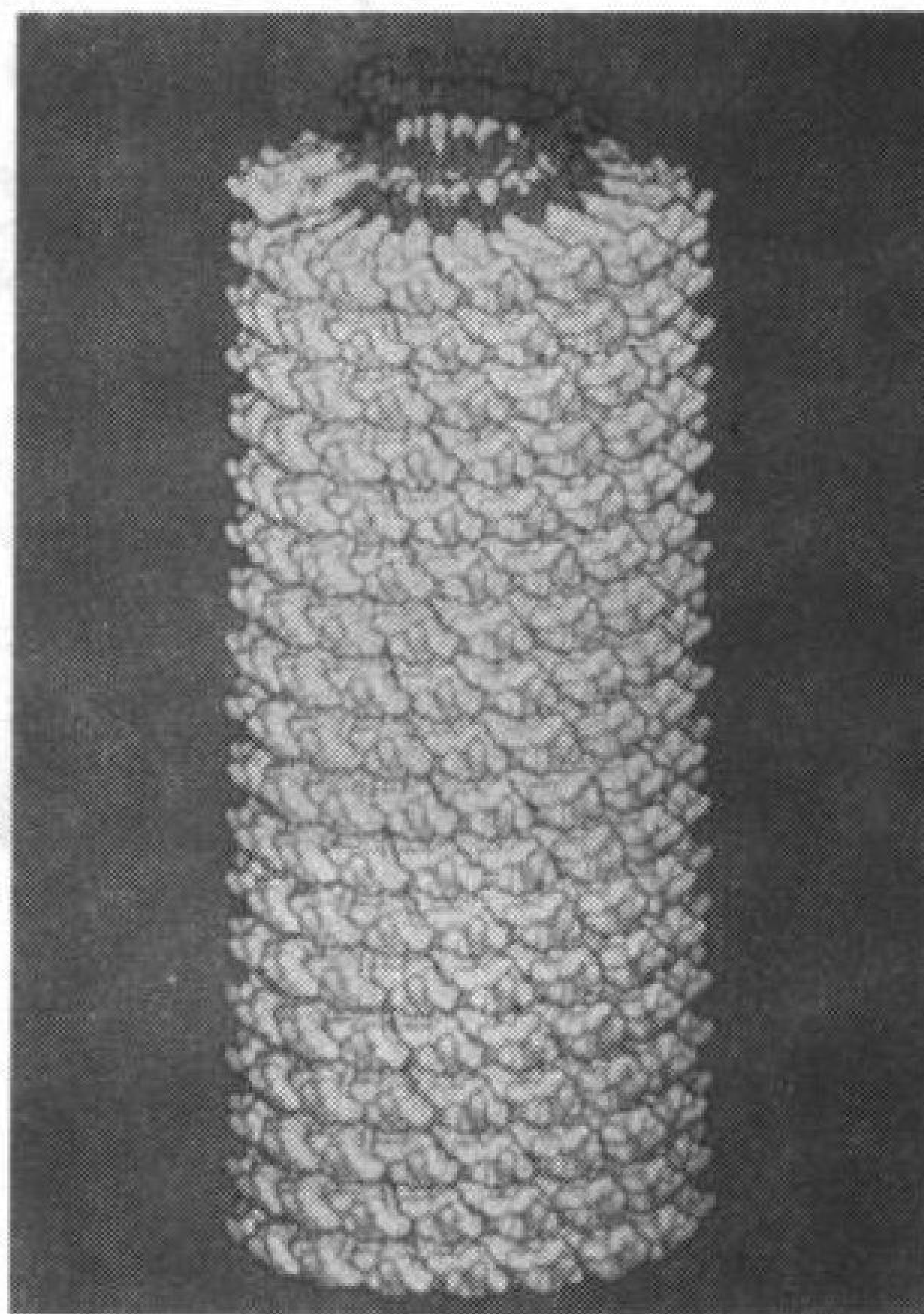
图 23-50 人中期染色体的横截面。
(a)电镜图。注意从中心脚手架抛射出的染色质丝物质。(b)示意图示出 0.3μm 长的径向环是如何与 0.4μm 宽的脚手架一起形成 1.0μm 直径的中期染色体。(引自瑞士 Geneva 大学的 Ulrich Laemmli)

粒子压缩以形成结合到蛋白脚手架上的大环，生成一个相对紧密的染色体。在病毒中要求将核酸分子包裹在小体积中是一个很严重的问题，其本质就是由蛋白外衣包裹 DNA 或 RNA(见框 23-3)。

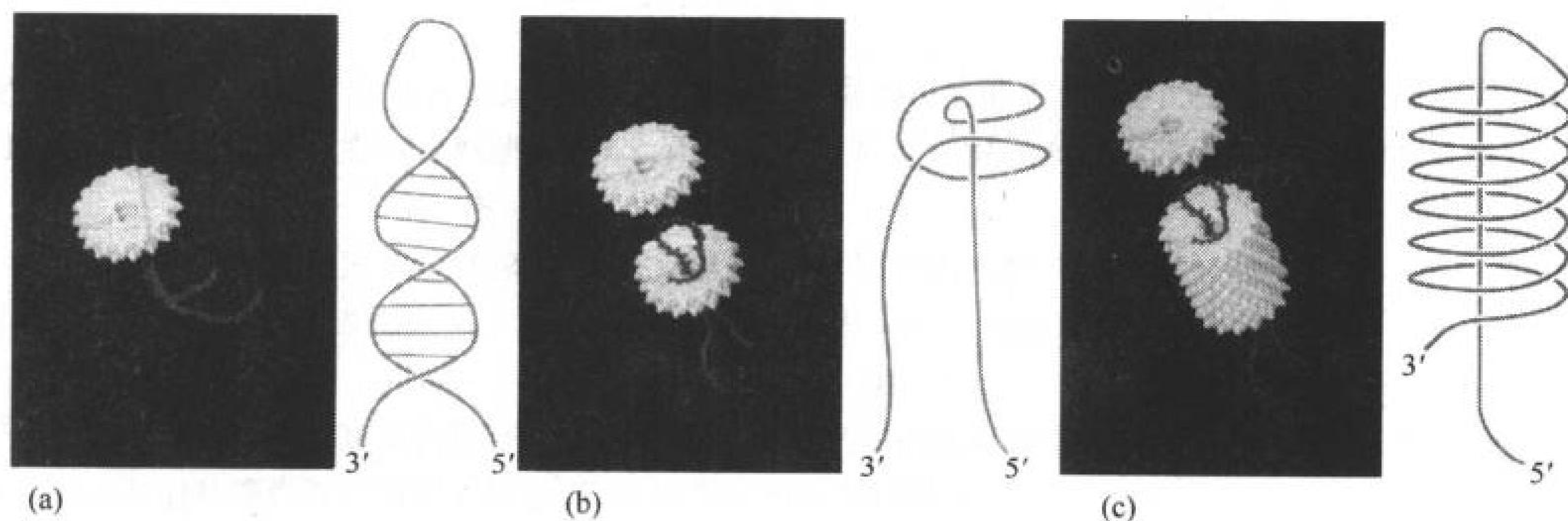
框23.3 生物化学焦点

包裹病毒核酸

病毒是一种寄生物，它由蛋白衣壳包裹的核酸分子构成，在某些情况下，还有脂类双层和糖蛋白膜。因为大多数病毒仅包含少数基因，它们依赖其宿主细胞的新陈代谢器官进行复制，因此病毒并不被认为是活的。病毒"基因组"很小，限制了其能编码蛋白的数量，它的外壳必须由一种或几种蛋白亚基排列成对称的形式。在**螺旋病毒**中，外壳蛋白亚基缔合以形成螺线管，然而在**球形病毒**中，外壳蛋白可聚集形成多面壳体。在这两种情况中，病毒核酸都位于衣壳的核心。



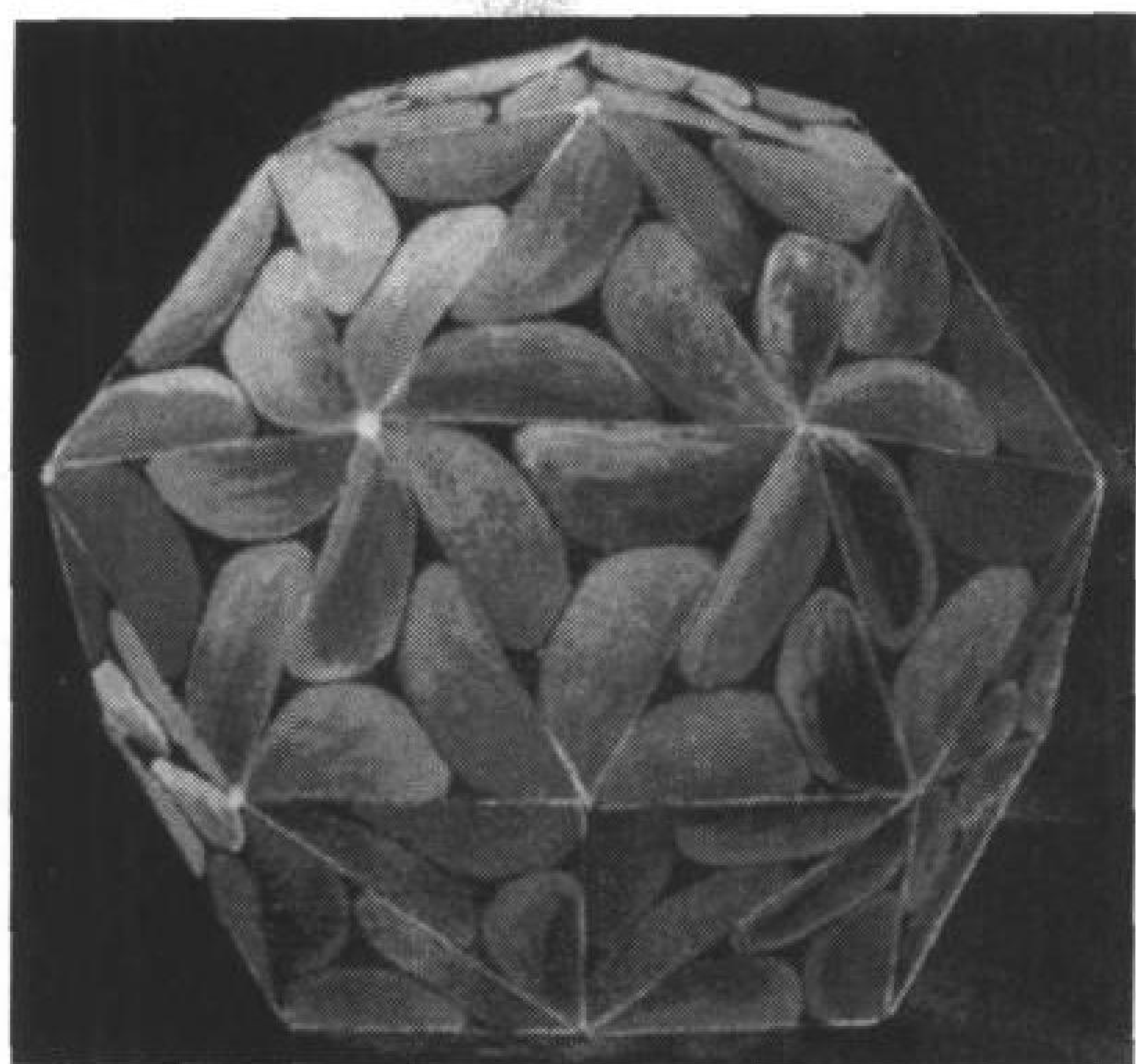
研究最透彻的病毒是**烟草花叶病毒**(tabacco mosaic virus, TMV)，一个约3000Å长，约180Å直径的柱状粒子。其外壳由约2130个完全相同的158残基的蛋白质组成。当34个楔形蛋白本能地形成一个薄的原始螺旋(下面部分a中的黄色结构)的时候，组装就开始了。病毒基因组，含约6400个核苷酸的RNA分子(红色)，形成发夹形嵌入到原始螺旋中心空腔中，因此3个核苷酸结合到1个蛋白亚基上(b)。随着更多的蛋白螺旋与不断生长的病毒粒子缔合，RNA被拖入中心空腔以形成一个直径约40Å的螺旋(c)。如下的模型为TMV的一部分，图中示出了病毒外壳蛋白亚基和RNA(暴露在病毒螺旋的顶部)的螺旋排列。

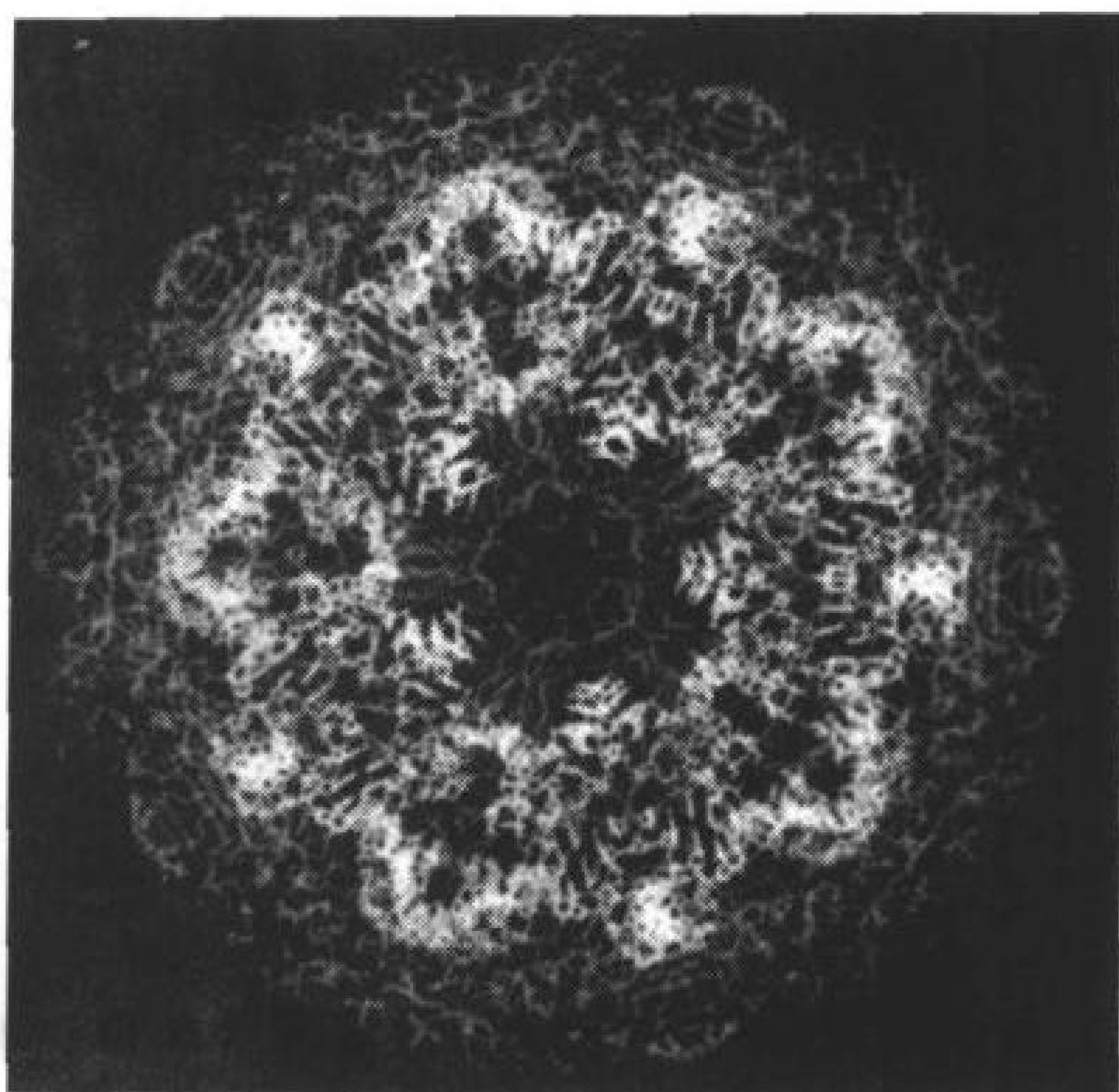


球形病毒为二十面体衣壳(capsid)，需要最少60个蛋白亚基。在二十面体每个三角形面上蛋白亚基的对称排布允许衣壳包含超过60个蛋白质。例如，直径为175Å的**番茄丛矮病病毒**(tomato bushy stunt virus, TBSV)排列有180个完全相同的衣壳蛋白，包围着一个约4800个核苷酸的RNA分子。

TBSV的衣壳蛋白实际上形成两层，RNA像三明治一样被夹在其中，这样的排列造成的空间约束迫使RNA紧密地压缩，据推测RNA磷酸基团上的负电荷应该被衣壳蛋白上大量带正电荷的Arg和Lys所中和。

卫星烟草花叶病毒(satellite tobacco mosaic virus, STMV)，可能是目前所知的最小病毒，它能够在被TMV感染的细胞内复制，它是直径为172Å的球形病毒，由60个完全相同的蛋白亚基构成，并把1059个核苷酸的RNA分子包在其中。该RNA(黄色)位于病毒衣壳(蓝色)表面下，大量的碱基配对。





TMV 图像引自 Hong Wang 和 Gerald stubbs, Vanderbilt University, TMV 模型引自 Gerald stubbs 和 Keiichi Namba, Vanderbilt University; and Donald Caspar, Brandeis University. Drawing of TBSV copyrighted (c) by Irning Geis. X-Ray structure of STMV courtesy of Alexaader McPherson, University of California at Riverside.]

小　　结

1. DNA 最常见形式是 B-DNA,它含有相似几何构型的 A·T 和 G·C 碱基对的右手双螺旋结构。A-DNA 螺旋(在双链 RNA 中同样存在)比 B-DNA 螺旋更宽更平。左旋 Z-DNA 螺旋出现在含有交替嘌呤和嘧啶的序列中。
2. 核酸中核苷酸的柔性是受到绕糖苷键的允许旋转角、糖环皱褶和糖-磷酸骨架扭转角的限制。
3. 天然 DNA 在未受破坏时是负超螺旋的。拓扑异构酶通过切断 DNA 一条或两条链,让 DNA 穿过切口然后缝合断裂的链来使超螺旋得到松弛。
4. 温度超过它们的 T_m 时可导致核酸失活,将其缓慢降温到低于 T_m25℃ 可使其复性。
5. 核酸结构由 Waston-Crick 碱基对、堆积碱基间疏水相互作用、二价阳离子屏蔽相邻磷酸基团等作用所稳定。
6. RNA 分子呈现出多样性的结构,包含双链茎干和单链环。一些 RNA 有催化活性。
7. 核酸可以用类似于分离蛋白的方法进行分离,包括溶解法、亲和色谱法、电泳和超速离心。
8. 专一序列的 DNA 结合蛋白首先通过直接和间接的氢键、范德华作用力和离子相互作用与大沟中的碱基和磷酸基团相互作用,蛋白和 DNA 的构象因结合都发生了改变。
9. DNA 结合蛋白中共同的超二级结构包括原核生物阻遏物中的螺旋-回转-螺旋超二级结构,真核转录因子中的锌指和亮氨酸拉链。
10. 真核生物染色质中的 DNA 环绕组蛋白八聚体形成核小体核心粒子,并在连接组蛋白的存在下进一步压缩。进一步的压缩导致染色质折叠成直径为 300Å 的细丝,随后以环状的形式附属到蛋白支架上以形成压缩(中期)的染色体。

参考文献

核酸结构

Bates, A.D. and Maxwell, A., *DNA Topology,* IRL Press (1993).

Berger, J.M., Gamblin, S.J., Harrison, S.C., and Wang, J.C., Structure and mechanism of DNA topoisomerase II, *Nature* **379,** 225–232 (1996).

Chu, G., Pulsed-field gel electrophoresis: theory and practice, *Methods* **1,** 129–142 (1990).

Dickerson, R.E., DNA structures from A to Z, *Methods Enzymol.* **211,** 67–111 (1992).

Hagerman, P.J. and Amiri, K.M.A., Hammering away at RNA global structure, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6,** 317–321 (1996). [A brief review of developments in tRNA and hammerhead ribozyme structure.]

Herbert, A. and Rich, A., The biology of left-handed Z-DNA, *J. Biol. Chem.* **271,** 11595–11598 (1996).

Jaeger, L., The new world of ribozymes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7,** 324–335 (1997). [Summarizes the catalytic versatility of RNA, with examples of naturally occurring and artificial ribozymes.]

Joshua-Tor, L. and Sussman, J.L., The coming of age of DNA crystallography, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3,** 323–335 (1993).

Patikoglou, G. and Burley, S.K., Eukaryotic transcription factor-DNA complexes, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **26,** 289–325 (1997).

Rossman, M.G. and Johnson, J.E., Icosahedral RNA virus structure, *Annu. Rev. Biochem.* **58,** 533–573 (1989).

Sharma, A. and Mondragón, A., DNA topoisomerase, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5,** 39–47 (1995).

Sinden, R.R., *DNA Structure and Function,* Academic Press (1994). [Reviews the structure and conformations of DNA with simple and clear diagrams.]

Snustad, D.P., Simmons, M.J., and Jenkins, J.B., *Principles of Genetics,* Wiley (1997). [This and other textbooks review DNA structure and function.]

Wahl, M.C. and Sundaralingam, M., New crystal structures of nucleic acids and their complexes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5,** 282–295 (1995).

染色质

Gruss, C. and Knippers, R., Structure of replicating chromatin, *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **52,** 337–365 (1996).

Luger, K., Mäder, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F., and Richmond, T.J., Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution, *Nature* **389,** 251–260 (1997).

van Holde, K. and Zlatonova, J., Chromatin higher order structure: chasing a mirage? *J. Biol. Chem.* **270,** 8373–8376 (1995). [Argues that chromatin structure is fundamentally irregular.]

Widom, J., Structure, dynamics, and function of chromatin in vitro, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27,** 285–327 (1998).

Wu, C., Chromatin remodeling and the control of gene expression, *J. Biol. Chem.* **272,** 28171–28174 (1997).

DNA-蛋白质相互作用

Aggarwal, A.K., Structure and function of restriction endonucleases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5,** 11–19 (1995).

Berg, J.M. and Shi, Y., The galvanization of biology: a growing appreciation of the roles of zinc, *Science* **271,** 1081–1085 (1996). [Summarizes different types of zinc fingers and discusses why zinc is suitable for stabilizing small protein domains.]

Choo, Y. and Klug, A., Physical basis of a protein–DNA recognition code, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7,** 117–125 (1997).

Harrison, S.C., A structural taxonomy of DNA-binding domains, *Nature* **353,** 715–719 (1991). [A succinct review of common structural motifs in DNA-binding proteins.]

Shakked, Z., Guzikevich-Guerstein, G., Frolow, F., Rabinovich, D., Joachimiak, A., and Sigler, P.B., Determinants of repressor/operator recognition from the structure of the *trp* operator binding site, *Nature* **368,** 469–473 (1994).

Somers, W.S. and Phillips, S.E.V., Crystal structure of the *met* repressor–operator complex at 2.8 Å resolution reveals DNA recognition by β-strands, *Nature* **359,** 387–393 (1992).

关　键　词

顺式构象　syn conformation
超螺旋　supercoiling
拓扑异构酶　topoisomerase
复性　anneal
反式构象　anti conformation
连接数　linking number
链状的　catenate
杂交　hybridize
C2′-内　C2′- *endo*
扭曲　twist
熔解曲线　melting curve
Watson-Crick 碱基对　Watson-Crick base pair
C3′-内　C3′-*endo*
缠绕数　writhing number
熔解温度　T_m
hoogsteen 碱基对　hoogsteen base pair
堆积相互作用　stacking interactions
阻遏物　repressor
亮氨酸拉链　leucine zipper
连接组蛋白　linker histone
核酸酶　ribozyme
操纵子　operator
HLH 超二级结构　HLH motif
核糖体　nucleosome

适体 aptamer
HTH 超二级结构 HTH motif
等高线长度 contour length
核小体核心粒子 nucleosome core particle
脉冲场凝胶电泳 pulsed-field gel electrophoresis
间接识读 indirect readout
剪切降解 shear degradation
连接 DNA linker DNA
转录因子 transcription factor
染色体 chromosome
嵌入剂 intercalation agent
锌指 zinc finger
染色质 chromatin
DNA 印迹 Southern blotting
七重重复 heptad repeat
组蛋白 histone

学习思考题

1. 总结 A-,B-,Z-DNA 之间的差异。
2. RNA 与 DNA 结构上有什么差异?
3. 拓扑异构酶 I、II 是如何改变 DNA 拓扑结构的?
4. 解释核酸分子的变性和复性。
5. 描述稳定核酸结构的几种作用。
6. 描述核酸和蛋白质间相互作用的类型。
7. 含转录因子的锌指的 DNA 结合是如何区别于原核生物阻遏物的 DNA 结合。
8. 描述在真核细胞中 DNA 是如何被包裹的。

练 习 题

1. 蛋白质氨基酸残基是由相邻三个碱基所确定。编码一个 50kDa 蛋白质的 B-DNA 片段的表观长度是多少? 如果包含相同基因的片段是 A-DNA 的构象,计算其表观长度。
2. 在 tRNA 分子中频繁出现异常碱基和非 Waston-Crick 碱基对。(a) 最有可能与 6-羟基嘌呤配对的碱基是什么碱基(节 22-1)? 画出该碱基对。(b)画出 G·U 碱基对的结构。
3. 可以通过超速离心测定与松弛环状 DNA 分子有关的沉降速率来估测其超螺旋程度。(a)超螺旋环的沉降速率比松弛环快还是慢? (b)超速离心能用来区别正或负超螺旋吗? 并加以解释。
4. 你已经发现一种由剧毒细菌分泌的酶能切割双螺旋 DNA 中脱氧核糖核酸残基的 C2′—C3′键,该酶对超螺旋 DNA 有什么作用?
5. 一个闭合的双螺旋 DNA 具有 100 bp 的片段,它由交替出现的 C 和 G 残基构成。将其转移至高浓度盐水中,该片段经历由 B 构象变为 Z 构象的过渡态。其连接数,超螺旋数,扭曲数有什么改变?
6. 比较在相同条件下,分别含有 20%A 残基和 30%A 残基的 1kb DNA 片段的熔解温度的差别。
7. 指出双螺旋 DNA 熔解曲线是如何受下列条件的影响的:
   (a) 降低溶液离子强度;
   (b) 加入少量的乙醇。
8. *E.coli* 核糖体包含 3 种以其沉降特性命名的 RNA 分子:5S、18S、28S RNA。绘制一离心试管,显示出 3 种 RNA 在蔗糖密度梯度溶液中离心沉降以后的相对位置。
9. *Trp* 阻遏物靶体 DNA 序列(节 23-4B) 的回文对称仅是一种偶然事件,其发生的概率是多少?
10. 对于一个 50 000kb 的 B-DNA,计算
    (a) 表观长度;
    (b) 在连接组蛋白存在下,包裹在核小体中的 DNA 长度;

(c) 在300Å细丝中的DNA长度。

11. 小鼠基因DNA经过限制性内切酶和琼脂糖凝胶电泳处理，由人类基因 *rxr-1* 制得的放射性探针用于进行Southern印迹。该实验重复做3次，解释每次重复实验的结果：

实验一　自动放射照片显示在小鼠DNA电泳槽道的顶部有一个污点；

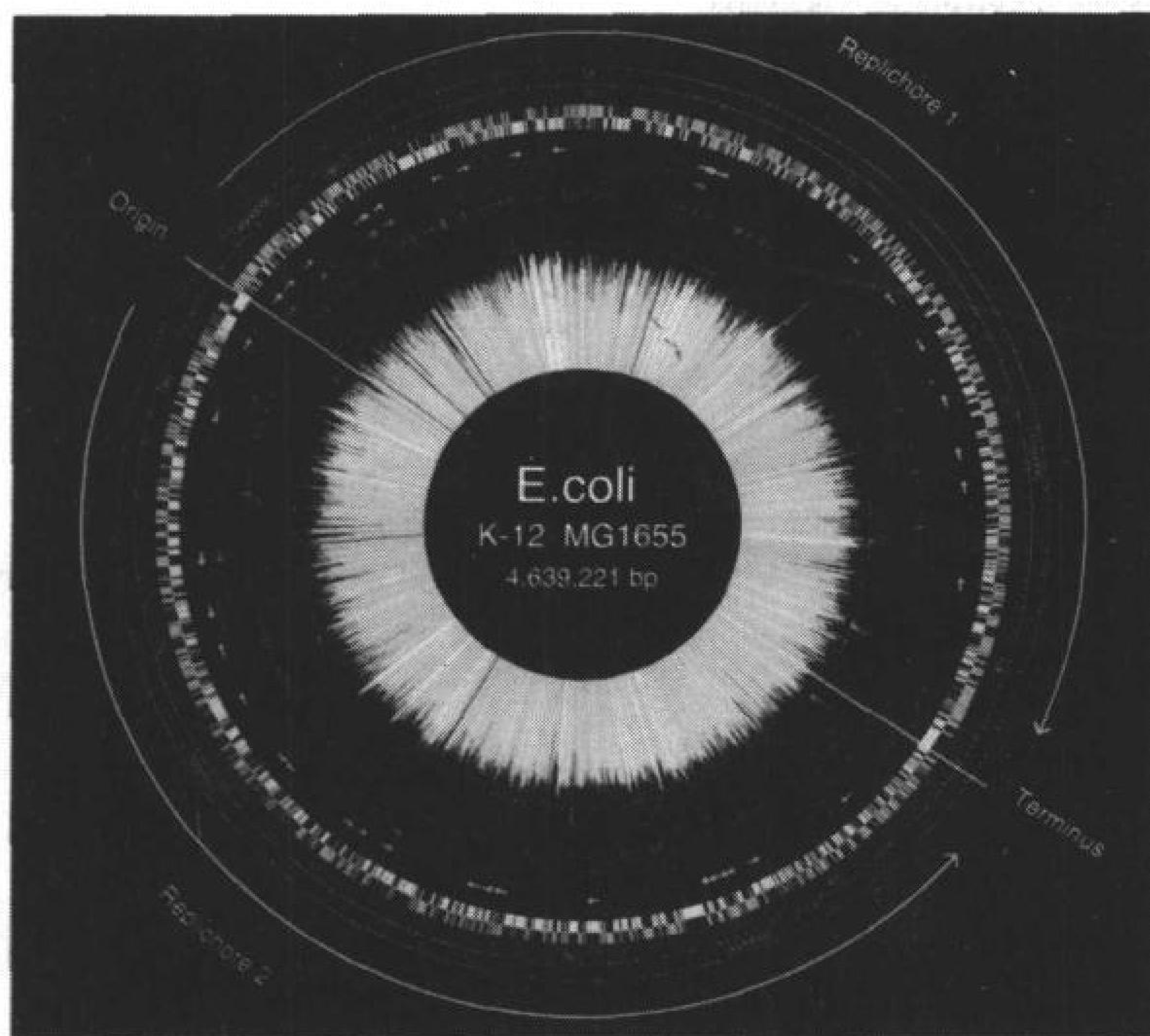
实验二　自动放射照片显示覆盖整个含有小鼠DNA电泳槽道的污点；

实验三　自动放射图片显示3条不同强度的带。

(习题由 Bruce Wightman 提供，Muhlenberg College)

(清华大学　周玉祥　译　郑昌学　校)

第 24 章　DNA 的复制、修复和重组



大肠杆菌染色体包含数千个基因，此处根据类型被排列在许多同心圆上。整个染色体是单个 DNA 分子，它必须快速而精确地被复制。错误固然会发生，但通常被修复以确保遗传信息的忠实传递。（经威斯康星大学的 Frederick Blattner 允许转载此图）

---

1. DNA 复制概论
2. 原核生物 DNA 的复制
   - A. DNA 聚合酶
   - B. 复制的起始
   - C. 前导链和后随链的合成
   - D. 复制的终止
   - E. 复制的忠实性
3. 真核生物 DNA 的复制
   - A. 真核生物的 DNA 聚合酶
   - B. 真核生物 DNA 复制的起始
   - C. 端粒和端粒酶
4. 突变
   - A. 化学诱变
   - B. 致癌剂
5. DNA 的修复
   - A. 损伤的直接回复
   - B. 核苷酸切除修复
   - C. SOS 反应和重组修复
6. 重组
   - A. 一般性重组的机制
   - B. 转座

Watson 和 Crick 开创性的论文，对 DNA 双螺旋的描述以这样一段陈述作为结尾："不出我们的意料，我们所假设的特异性配对立即提示一种遗传物质可能的复制机制。"正如他们预计的那样，当 DNA 复制时，每条多核苷酸链都作为通过碱基配对相互作用而生成互补链的模板。亲代分子的两条链因此必须分开，从而使互补的子链能在每条亲链的表面由酶促合成。结果产生两个双螺旋 DNA 分子，每个都含有一条来自亲代分子的多核苷酸链，以及一条新合成的互补链（图 3-14）。这种复制模式被称为**半保留复制**（semiconservative replication）（在全保留复制中，亲代 DNA 将保持完整，而子代双螺旋的两条链都将是新合成的）。

DNA 复制的半保留复制在 1958 年被 Matthew Meselson 和 Franklin Stahl 巧妙地证明。通过用氮的重同位素 ^{15}N（^{14}N 是天然存在的富集同位素）进行标记可以提高 DNA 的密度。这可以通过在含有以 $^{15}NH_4Cl$ 作为惟一氮源的培养基中生长大肠杆菌来实现。被标记的细菌然后被立即转至含 ^{14}N 的培养基中，并且它们 DNA 的密度通过平衡密度梯度超离心（节 5-2E）被监测好几代。

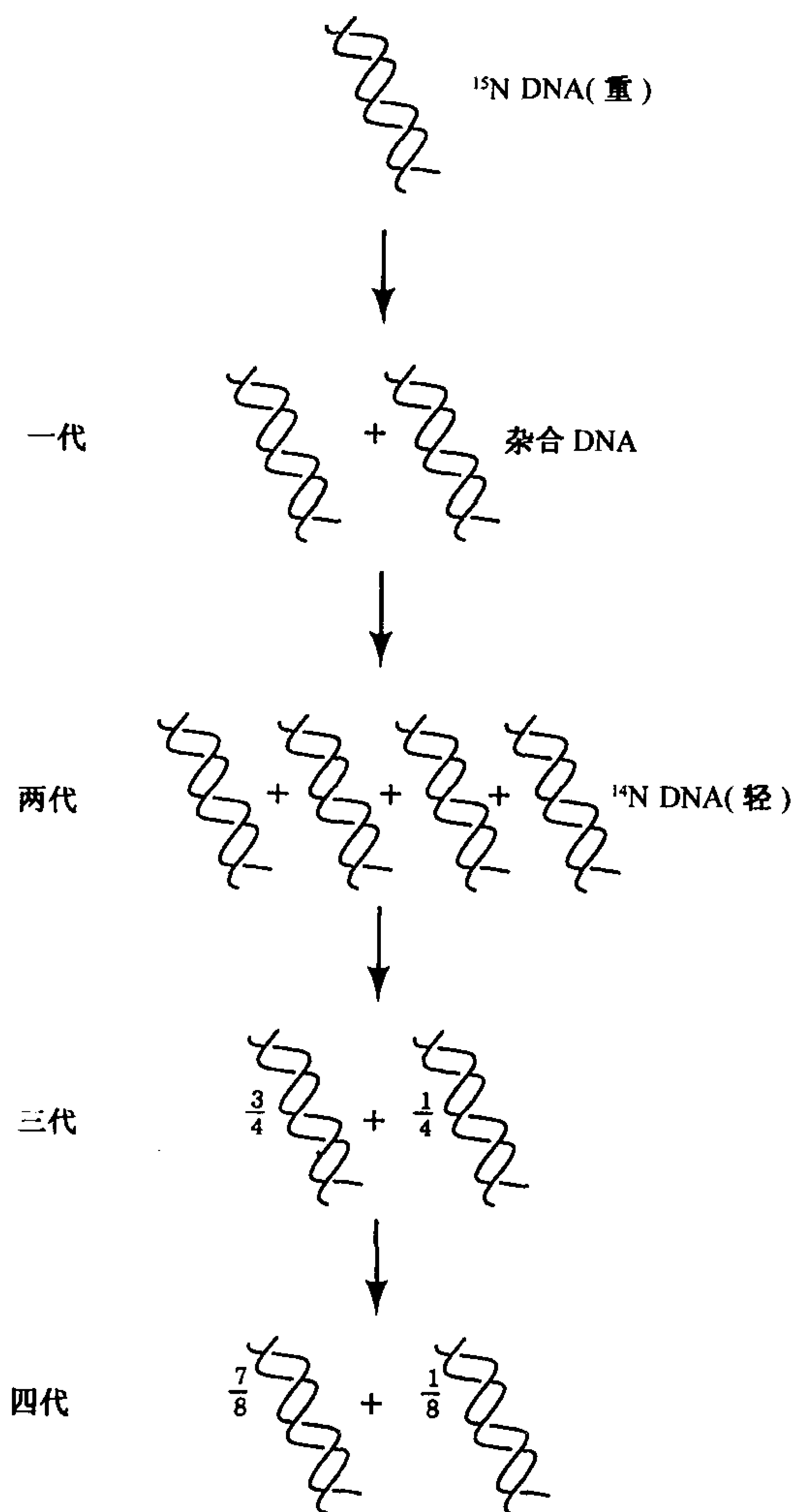


图 24-1 Meselson 和 Stahl 实验

亲代（^{15}N－标记的或"重"的）DNA 被半保留复制，因此第一代 DNA 分子含有一条亲链（蓝）和一条新合成链（红）。在以后的世代中，^{14}N－标记的（"轻"）链的比例增加，但含有一重一轻链的杂合分子依旧存在。

Meselson 和 Stahl 发现经过一代以后（细胞数量倍增一次），所有 DNA 的密度恰好是完全被 ^{15}N 标记的 DNA 与未被标记的 DNA 总和的一半。因此这种 DNA 一定含有等量的 ^{14}N 和 ^{15}N，正如经过一代半保留复制后所预期的那样（图 24-1）。相反地，全保留 DNA 复制将保存完全被 ^{15}N 标记的亲链，并产生等量的未被标记的 DNA。经过两代之后，半数 DNA 分子是未标记的，而其余的则为 ^{14}N-^{15}N 杂合分子。在随后的传代中，未被标记的 DNA 数量相对于杂合分子在增加，尽管杂合分子永远不会完全消失。这与半保留复制相符合，但和全保留复制不一致，在全保留复制中杂合 DNA 永远不会形成。

DNA 复制的详细过程，包括亲链的解开以及由核苷三磷酸组装为互补链，自从 1958 年以来已逐渐清楚。DNA 复制远比所设想的这一过程的总体化学要复杂，主要是因为复制必须极其精确，以保持染色体在从上一代传至下一代时的完整性。在本章中，我们要仔细考察介导原核生物和真核生物 DNA 复制的蛋白质组装体。同时我们也要讨论在复制过程中确保忠实性以及修正聚合错误和其他类型 DNA 损伤的机制。

1. DNA 复制概论

DNA 是由被称为 **DNA 指导的 DNA 聚合酶**，或简称 **DNA 聚合酶**（DNA polymerase）所复制的。这些酶利用单链 DNA 作为模板，并在其上由适当的脱氧核苷三磷酸来合成互补链（图 24-2）。反应是通过正在生长的 DNA 链的 3′-羟基对即将掺入的核苷三磷酸的 α-磷酸基的亲核进攻而进行的。该反应由随后释放出的焦磷酸的水解所驱动，否则反应将是可逆的。掺入的核苷酸根据它们与模板 DNA 形成 Watson-Crick 碱基配对的能力而被选择，因此新合成的 DNA 链和其模板链形成一个双螺旋。几乎所有已知的 DNA 聚合酶只能往一条碱基配对正确的多核苷酸的自由 3′-羟基上加一个核苷酸，因此，DNA 链只能由 5′→3′方向延伸。

774

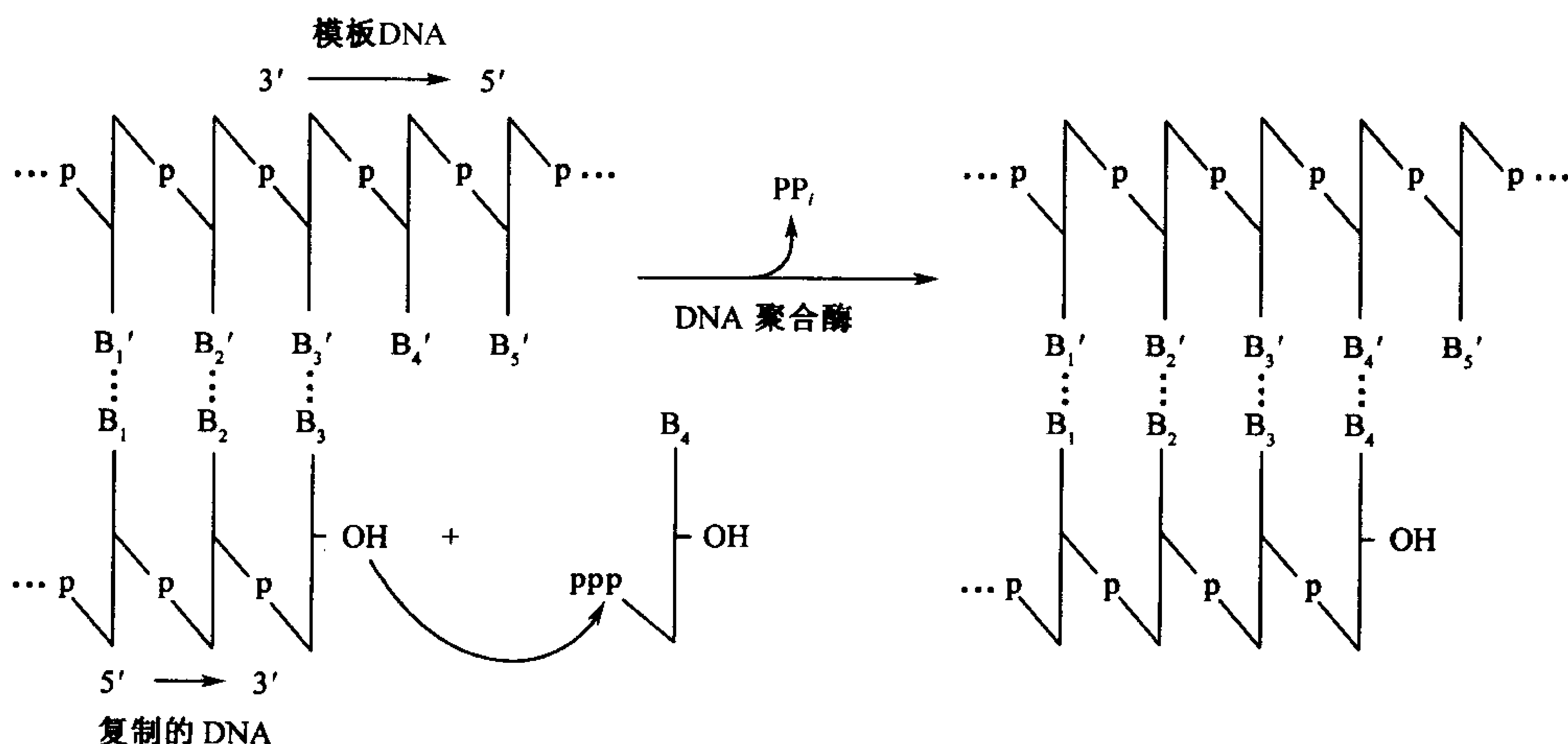


图 24-2 DNA 聚合酶的作用

这些酶把进来的脱氧核苷三磷酸组装到单链 DNA 模板上，从而生长链按 5′→3′方向被延长。

DNA 复制发生在复制叉处

John Cairns 通过含有[^{3}H]胸（腺嘧啶脱氧核）苷的培养基中生长的大肠杆菌染色体的放射自显影来观察 DNA 的复制。这些环状染色体含有被称为 **θ 结构**（因为它们像希腊字母 theta，θ）的复制“眼”或“泡”（图 24-3），当两条 DNA 亲链解离以允许合成其互补子链时便形成这些 **θ 结构**。涉及 θ 结构的 DNA 复制被称为 **θ 复制**。

复制眼中的分支点是 DNA 合成发生之处，它被叫作**复制叉**（replication fork）。一个复制泡可以含有一个或两个复制叉（**单向**或**双向复制**）。放射自显影研究证实 θ 复制几乎全是双向的（图 24-4）。换句话说，DNA 合成从复制起始点处沿着两个方向进行。

775

复制半不连续性

放射自显影提供的低分辨率图像，例如图 24-3 和图 24-4b，提示双螺旋 DNA 的两条反向平行链在一个前进中的复制叉处是同时被复制的。然而，由于 DNA 聚合酶只能沿 5′→3′方向延伸 DNA 链，那么 DNA 聚合酶是如何拷贝从 5′→3′方向经过复制叉的亲链的呢？这个问题在 1968

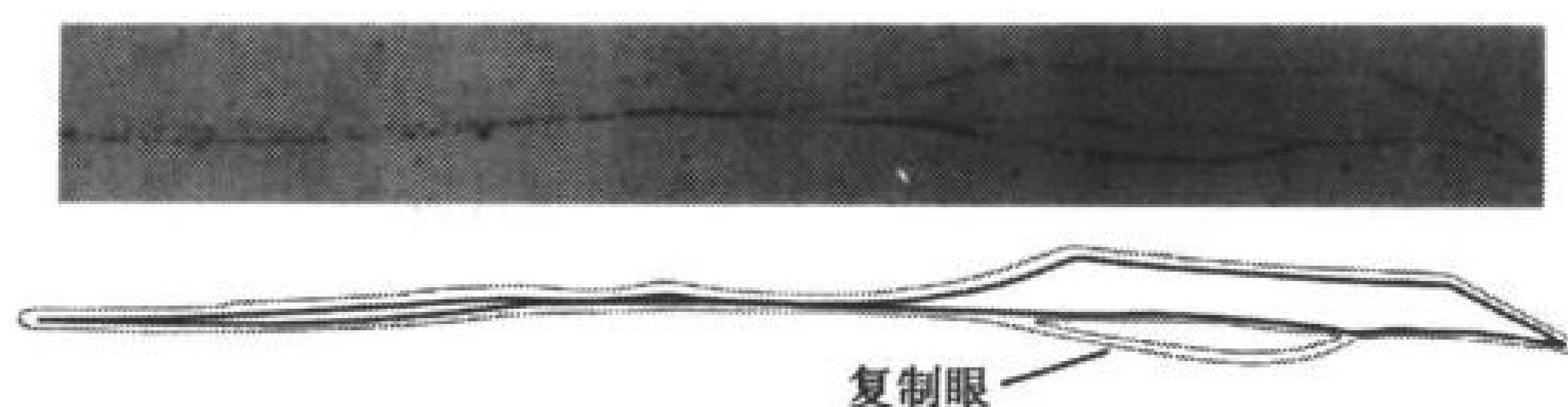


图 24-3 一条正在复制的大肠杆菌染色体的放射自显影图及其示意图

细菌先在含[^{3}H]胸腺嘧啶的培养基中生长,因此随后合成的 DNA 被标记,从而在相片感光乳剂中看上去像是许多排成线状的深色谷粒(示意图中的红线)。复制眼的大小显示这个环状染色体大约被复制了六分之一。

(Courtesy of John Cairns, Cold Spring Harbor Laboratory)

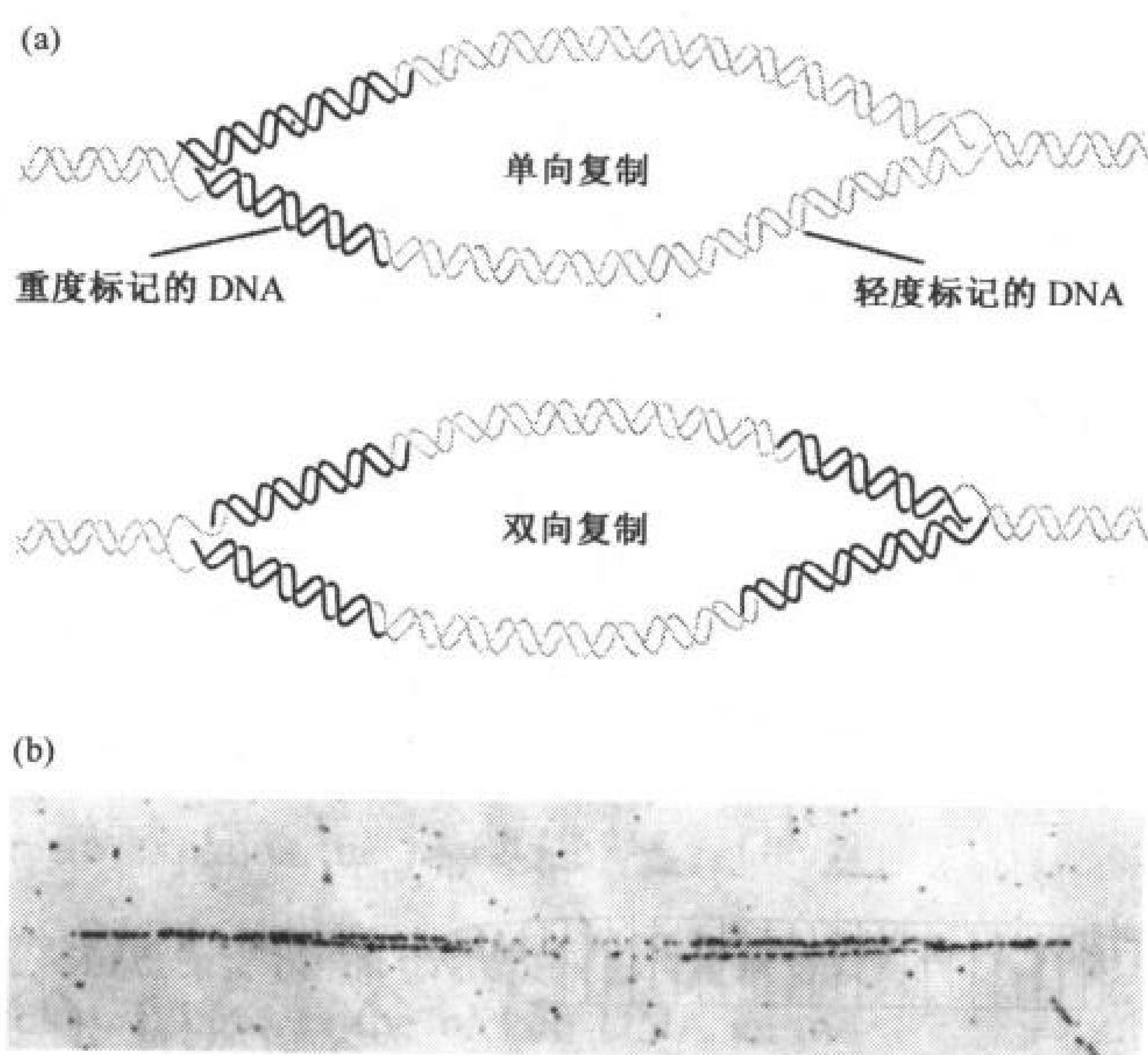


图 24-4 单向及双向 DNA θ 复制的放射自显影的区别

(a)将一种生物在一种被[^{3}H]胸腺嘧啶轻度标记的培养基中生长几代,因此其所有的 DNA 可在放射自显影图中被看到。为了重度标记复制叉附近的碱基,将大量的[^{3}H]胸腺嘧啶在 DNA 被分离之前加入该培养基中几秒钟(脉冲标记)。单向 DNA 复制只表现出一个重度标记的分支点,而双向 DNA 复制表现出两个这样的分支点。(b)表明 DNA 双向复制的大肠杆菌的放射自显影图。(经科罗拉多大学 David M. Prescott 和 P.L. Kuempel 的允许转载此图)

年由冈崎通过以下实验得以回答。如果将正在生长中的大肠杆菌培养液用[^{3}H]胸苷脉冲标记 30s,许多带放射性的因而是新合成的 DNA 由 1000~2000 个**核苷酸**(nt)片段组成(在真核生物中,这些所谓的**冈崎片段**为 100~200nt 长)。当这些细胞在[^{3}H]胸苷脉冲标记之后被转入非标记培养基中时,被标记的片段的大小随时间而增加。因此冈崎片段一定是被共价掺入到大分子的 DNA 中的。

冈崎根据**半不连续复制**(semidiscontinuous replication)模型(图 24-5)解释了他的实验结果。两条亲链以不同方式被复制。沿 5′→3′按照复制叉的移动方向延伸的新合成的 DNA 链,即**前导**

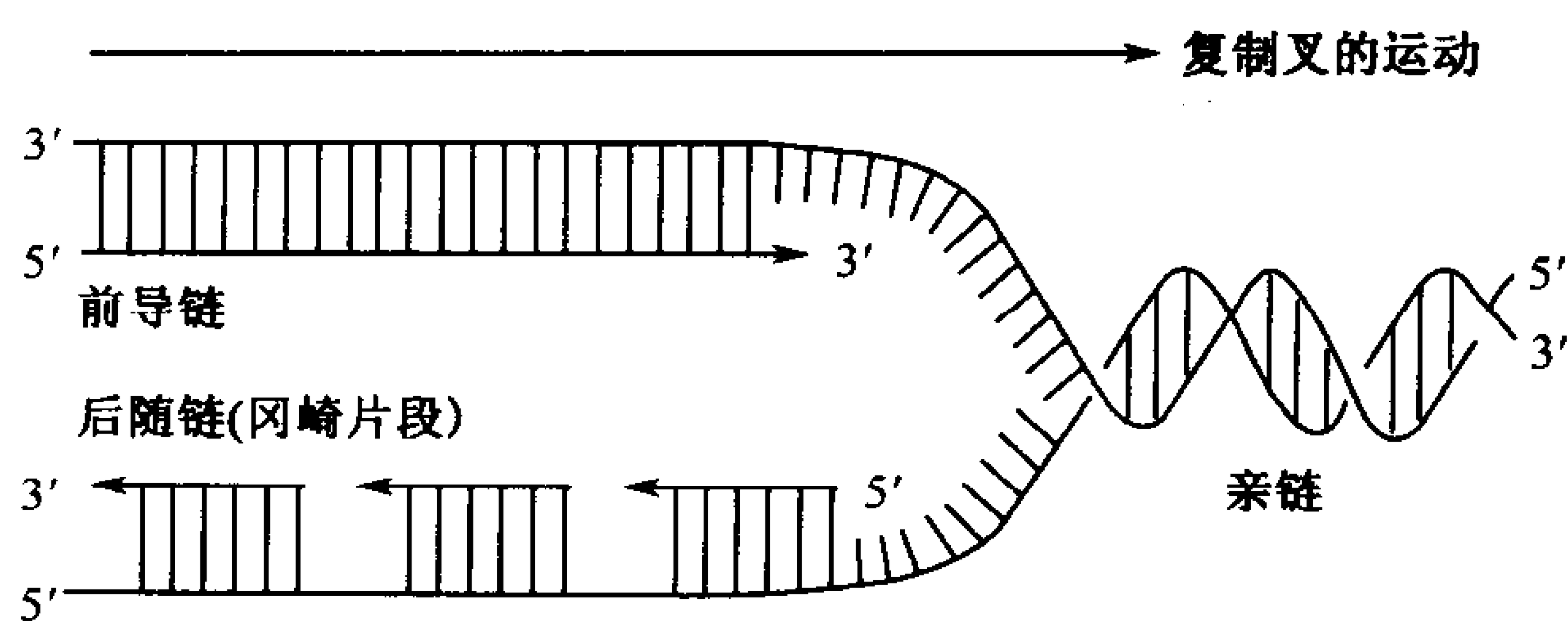


图 24-5　DNA 半不连续复制两条子链(红)都沿其 5′→3′方向被合成。前导链被连续合成,而后随链被不连续合成

链(leading strand),在复制叉前进时沿 5′→3′方向被连续合成。另一条新链,即**后随链**(lagging strand),也是沿 5′→3′方向被合成。然而,它只能在单链亲代 DNA 刚刚暴露于复制叉处时被不连续地生成冈崎片段。冈崎片段随后被 **DNA 连接酶**共价地连在一起。

DNA 的合成延伸 RNA 引物

DNA 聚合酶需要一个自由 3′-羟基以延长 DNA 链,那么 DNA 合成是如何

776

起始的呢?对冈崎片段的仔细分析表明它们的 5′末端由 1～60 个核苷酸长(这一长度取决于物种)的 RNA 片段所组成(图 24-6)。这个片段和模板 DNA 链互补。在大肠杆菌中,这些 **RNA 引物**(RNA primer)由**引物酶**(primase)合成。后随链的合成需要多次引发作用,而起始前导链的合成只需一次引发。然而,成熟的 DNA 是不含 RNA 的,RNA 引物最终被 DNA 所置换。

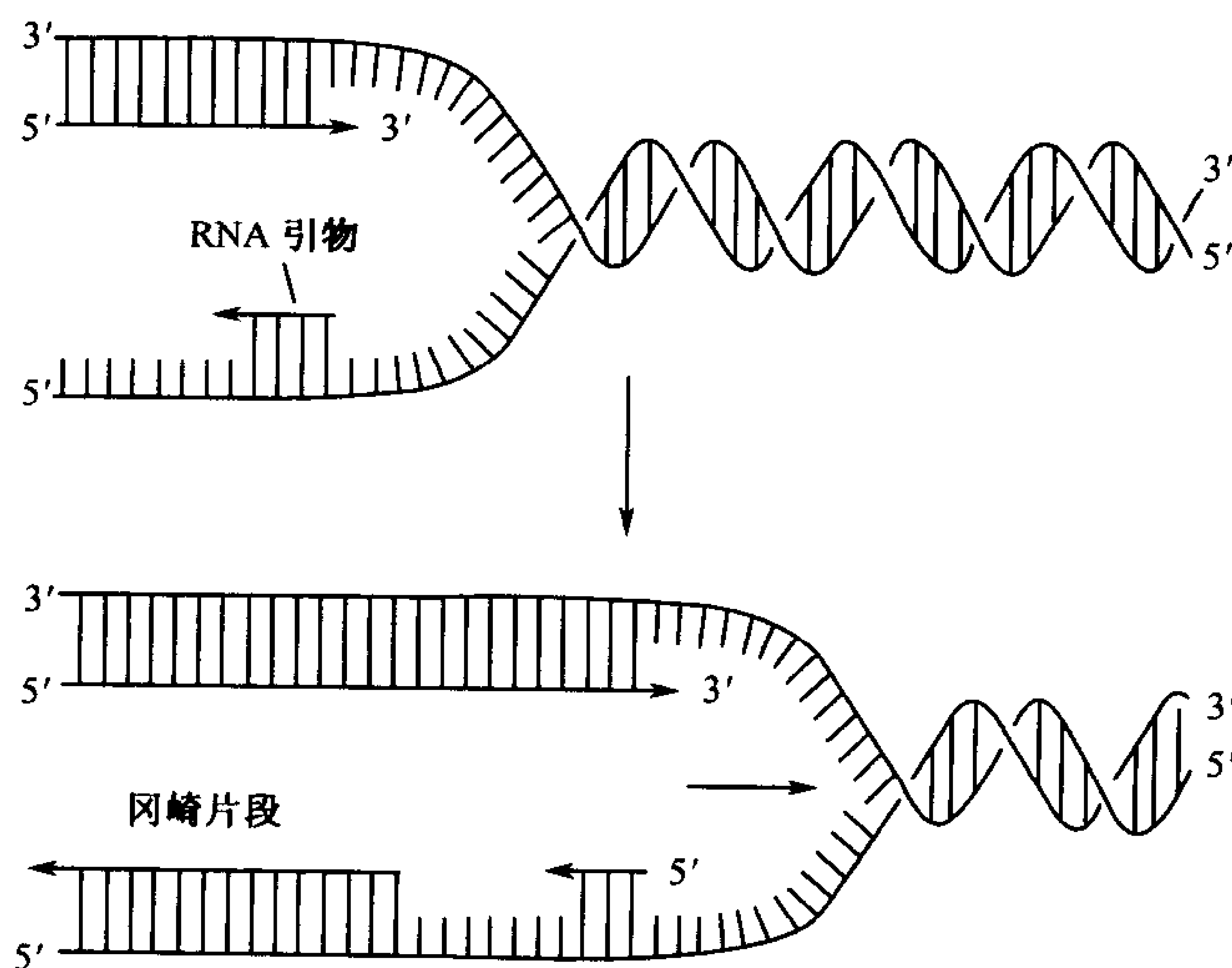


图 24-6　由短 RNA 片段引发的 DNA 合成

2. 原核生物 DNA 的复制

除了上述酶之外,DNA 的复制还涉及大量其他的酶。许多需要的酶首先是从原核生物中分离到,因此对它们的了解比对真核生物中对应的酶了解更好。为此,我们从原核生物 DNA 复制的详细讨论开始。真核生物中的复制则在 24-3 节中讨论。

A. DNA 聚合酶

1957 年,Arthur Kornberg 在大肠杆菌中发现一种催化 DNA 合成的酶,这一发现建立在该酶能够将放射性标记的[^{14}C]胸苷三磷酸掺入到 DNA 中的基础上。这种酶现在被称为 **DNA 聚**

合酶I或**Pol I**(聚合酶I),由一条928个残基的多肽组成。Pol I被认为是一种**加工性酶**,因为它催化一系列连续的核苷酸聚合步骤,通常是20个或更多,而不释放单链模板。

PolI具有外切核酸酶活性

除聚合酶活性之外,PolI还具有不同活性中心的两种独立的水解活性:即3′→5′外切核酸酶活性和5′→3′外切核酸酶活性。3′→5′外切核酸酶活性允许Pol I校正其错误。如果Pol I"不慎"在一条正在成长的DNA链的末端掺入了一个错配的核苷酸,其聚合酶活性就被抑制,而3′→5′外切核酸酶活性将这个错配核苷酸水解切除(图24-7)。聚合酶活性随即恢复DNA的复制。这种**校正**(proofreading)机制解释了由PolI催化的DNA复制的高度忠实性。

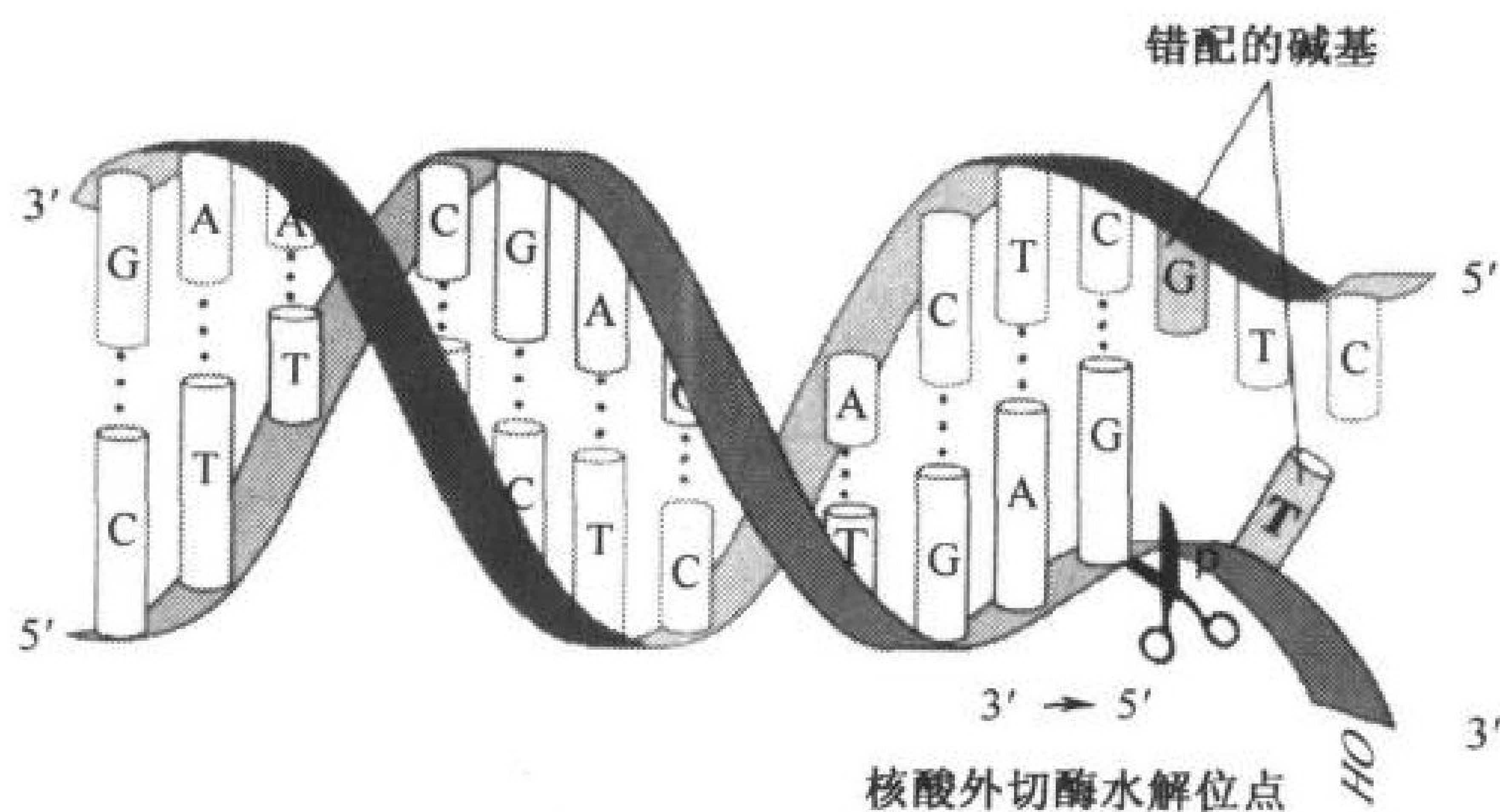


图24-7 DNA聚合酶I的3′→5′外切核酸酶功能
这种酶活性从正在生长的DNA链(蓝)的3′末端切除错配核苷酸。

777

Pol I的5′→3′外切核酸酶在单链缺口(断裂)处与双螺旋DNA结合。它切割带切口DNA链切口区外的碱基配对区域,从而将DNA剪切成单核苷酸或多至10个残基的寡核苷酸(图24-8)。

尽管Pol I是最早被发现的大肠杆菌DNA聚合酶,但它并不是大肠杆菌首要的复制酶。

相反,其最重要(并且是惟一必需)的功能是对后随链的合成。在此,它去除RNA引物,并以DNA替换。这一过程涉及Pol I的5′→3′外切核酸酶活性和聚合酶活性协同剪切新(后合成的)老(先合成的)冈崎片段之间的单链缺口的5′末端的核糖核苷酸,并将其置换为脱氧核糖核苷酸,附加在老冈崎片段的3′末端(图24-9)。缺口因此被平移(移动)向DNA链的3′末端,这一过程被称为**缺口平移**(nick translation)。当RNA被全部剪切后,缺口通过DNA连接酶(节24-2C)的作用被封口,从而将新老冈崎片段连在一起。

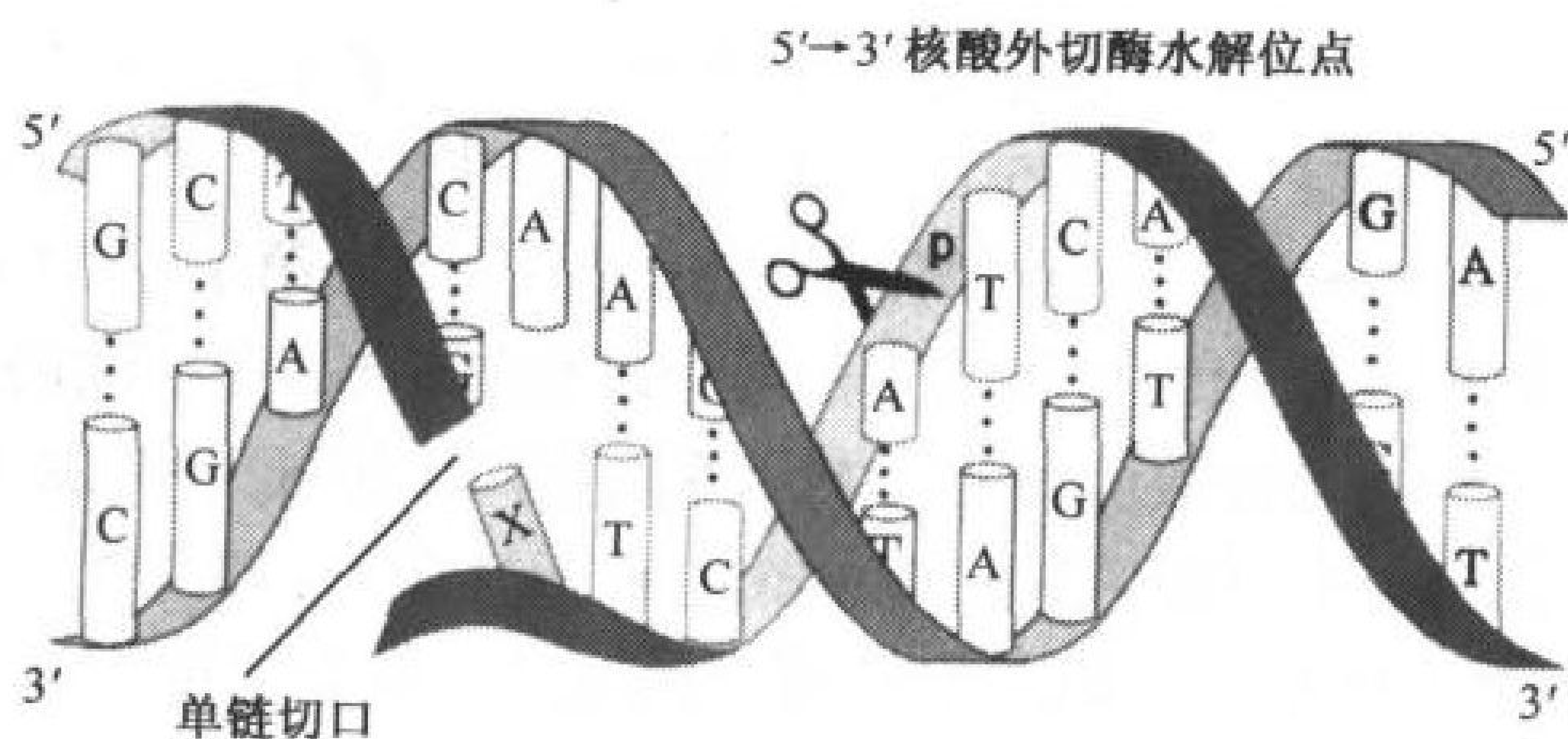


图24-8 DNA聚合酶I的5′→3′外切核酸酶功能
这种酶活性从一个单链切口的5′末端最多可切除10个核苷酸。紧跟在切口后面的核苷酸(X)可以是配对的,也可以是不配对的。

生物化学家们利用缺口平移来制备放射性DNA。双链DNA经少量**DNA酶I**(DNase I)处理后产生有限数量的缺口。随后加入放射性标记的dNTP,同时利用Pol I平移缺口,从而将未标记的脱氧核苷酸置换为标记的脱氧核苷酸。

Pol I在损伤的DNA的修复中也起作用。正如我们在节24-5所讨论的那样,损伤的DNA可被多种不同的DNA修复系统检测到,其中许多以核酸内切的方式切除损伤处5′端的

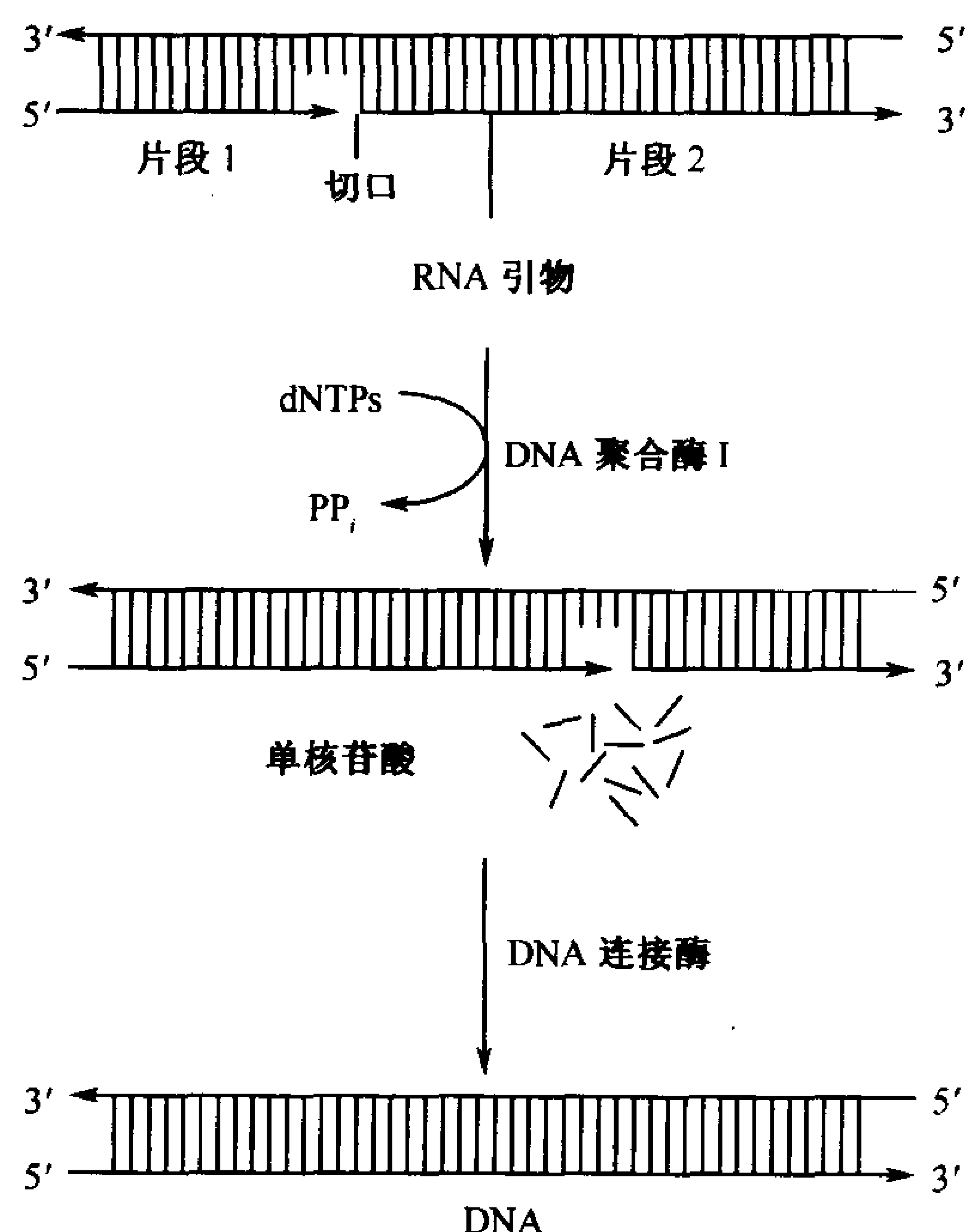


图 24-9　RNA 引物在后随链合成中被 DNA 置换
新合成的冈崎片段(片段 2)5′末端的 RNA 引物,通过 Pol I 的 5′→3′外切核酸酶功能被切除,并且通过其聚合酶功能被置换。它在先前合成的冈崎片段(片段 1)的 3′末端添加脱氧核苷酸。原来在 RNA 5′末端的切口从而被平移到其 3′末端的位置(切口平移)。该切口被 DNA 连接酶的作用封口。

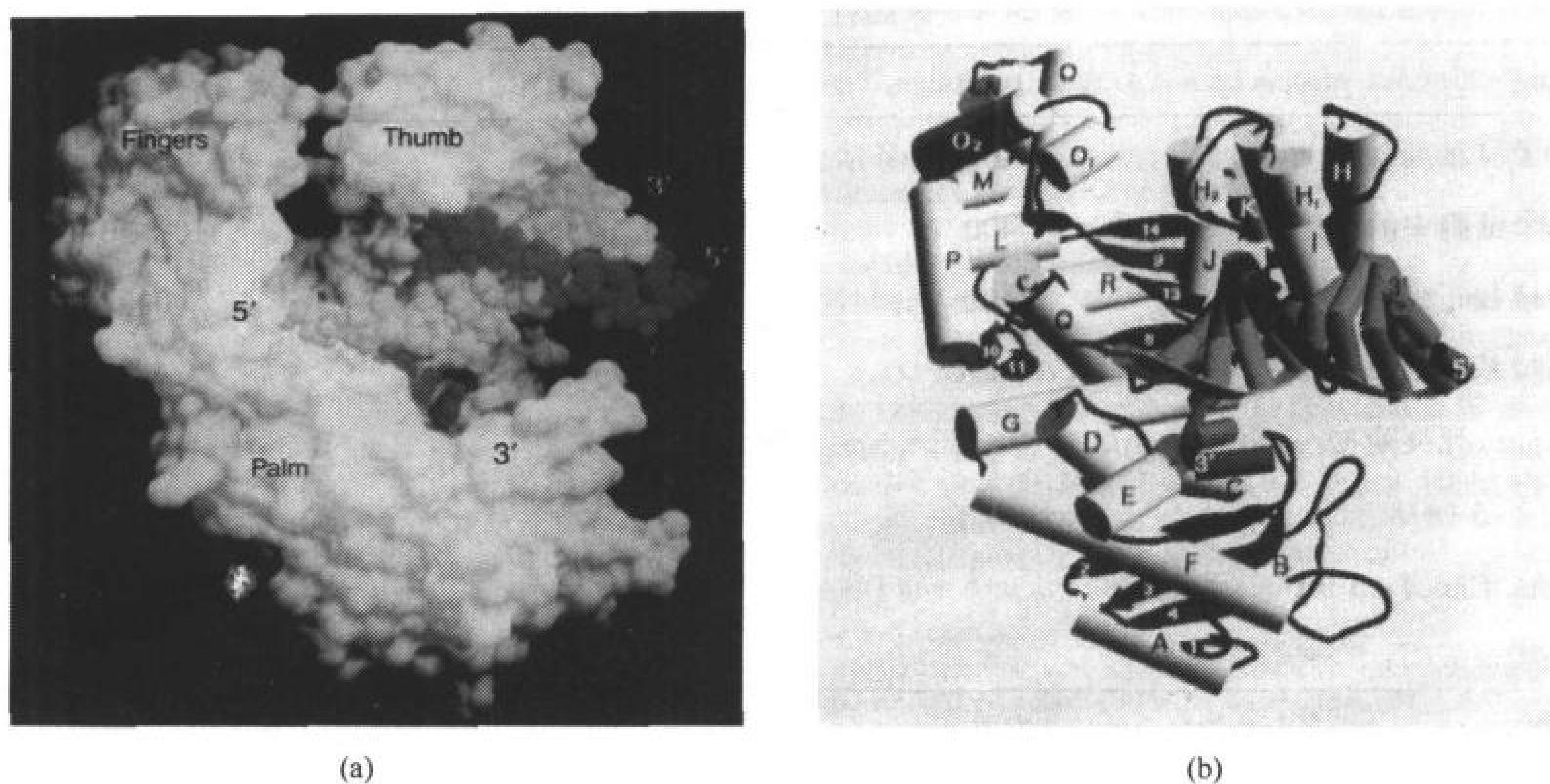
DNA。Pol I 的 5′→3′外切核酸酶活性随后切除损伤的 DNA,同时其聚合酶活性将产生的单链空隙填平。这和置换冈崎片段中 RNA 引物的方式相同。因此 PolI 在大肠杆菌 DNA 复制及修复中具有不可缺少的作用,尽管它并不是如最初想象的那样负责大部分 DNA 的合成。

778

Klenow 片段的结构

大肠杆菌 DNA 聚合酶 I,这种蛋白质的 3 种酶活性占据着 3 个分离的活性中心,它可以通过蛋白质水解的方式被切割成一个包含聚合酶和 3′→5′外切核酸酶活性的大片段,或称 **"Klenow"片段**(第 324～928 残基),以及具有 5′→3′外切核酸酶活性的一个小片段(第 1～323 残基)。由 Thomas Steitz 测定的 Klenow 片段的 X 射线结构表明它由两个结构域组成(图 24-10)。较小的结构域(第 324～517 残基)具有 3′→5′外切核酸酶位点。较大的结构域(第 521～928 残基;图 24-10b 中的螺旋 G 及其以远)包含位于一个显著裂隙底部的聚合酶活性中心,它离 3′→5′外切核酸酶活性中心的距离出乎意外的大(约 25Å)。衬以正电荷残基的裂隙具有合适的大小和形式(约 2.2～30Å),类似以右手握住一根棍子的方式与一段 B 型 DNA 结合:"拇指"由螺旋 H～I 组成;"手指"是螺旋 L～P;较大结构域的剩余部分则是"手掌",包括构成裂隙底部的一个六链反平行 β 折叠。所有已知结构的 DNA 和 RNA 聚合酶活性中心都位于形状类似的裂隙的底部。

Steitz 将 Klenow 片段和一段短的 DNA"模板"链以及一段互补的"引物"链共结晶。该蛋白



(a) (b)

图 24-10 大肠杆菌 DNA 聚合酶 I Klenow 片段和一段双螺旋 DNA 所形成复合物的 X 射线结构
(a)带有一段(青色)12nt DNA 模板链和一段(红色)14nt 引物链的 Klenow 片段的溶剂可及表面。
(b)一个和 a 方向相同的筒-箭头复合物模型,其中模板链为蓝色,引物链为洋红色。
(经耶鲁大学 Thomas Steitz 允许转载此图)

质只结合双螺旋 DNA 的磷酸骨架,这与 Pol I 在结合 DNA 时的无序列特异性相吻合。聚合酶和 3′→5′外切核酸酶活性中心是分离的,提示被结合的 DNA 在穿梭于这些中心之间需经历大的构象转变。

DNA 聚合酶 III 是大肠杆菌的 DNA 复制酶

779

具有很少(但并非完全没有)Pol I 活性、生长正常的大肠杆菌突变体的发现,促进了对其他 DNA 聚合活性的探索。这种努力因发现另外两种酶而得到回报,这两种酶按照它们被发现的顺序分别命名为 **DNA 聚合酶 II(Pol II)**以及 **DNA 聚合酶 III(Pol III)**。这些酶和 Pol I 的性质比较见表 24-1。Pol II 和 Pol III 以前所以未被发现,是因为它们加在一起的活性在所用的测活方法中通常不及聚合酶 I 的 5%。Pol II 参与 DNA 的修复,因此缺少聚合酶 II 的突变细胞可以正常生长。可是 Pol III 的缺失是致死的,这表明它是大肠杆菌的 DNA 复制酶。

Pol III 的催化核心由 3 个亚基组成:α 亚基(大肠杆菌卵 *polC* 基因产物),它具有复合物的 DNA 聚合酶活性;ε 亚基则具有 3′→5′外切核酸酶活性;以及 θ 亚基。至少还有其他 7 种亚基([illegible] 4-2)共同组成了被称为 Pol III 全酶的一个不稳定的多亚基酶。Pol III 核心的催化性质和 Pol I 相似,只是 Pol III 没有作用于双链 DNA 的 5′→3′外切核酸酶的活性。因此,Pol III 可以合成与一条单链模板互补的 DNA 链,并可校正聚合反应,从而提高复制的忠实性,但它不能催化缺口平移。

表 24-1 大肠杆菌 DNA 聚合酶的性质

	Pol I	Pol II	Pol III
分子质量/kDa	103	90	130
每个细胞中的分子数[a]	400	?	10～20
转换数	600	30	9000
结构基因	*polA*	*polB*	*polC*
条件致死突变物	+	−	+
聚合:5′→3′	+	+	+
外切核酸酶：3′→5′	+	+	+
外切核酸酶：5′→3′	+	−	−

[a] 在 37℃ 时每个分子每分钟聚合的核苷酸数。

引自:Kornberg, A. and Baker, T.A., DNA Replication(2nd ed.), P.167, Freeman(1992)。

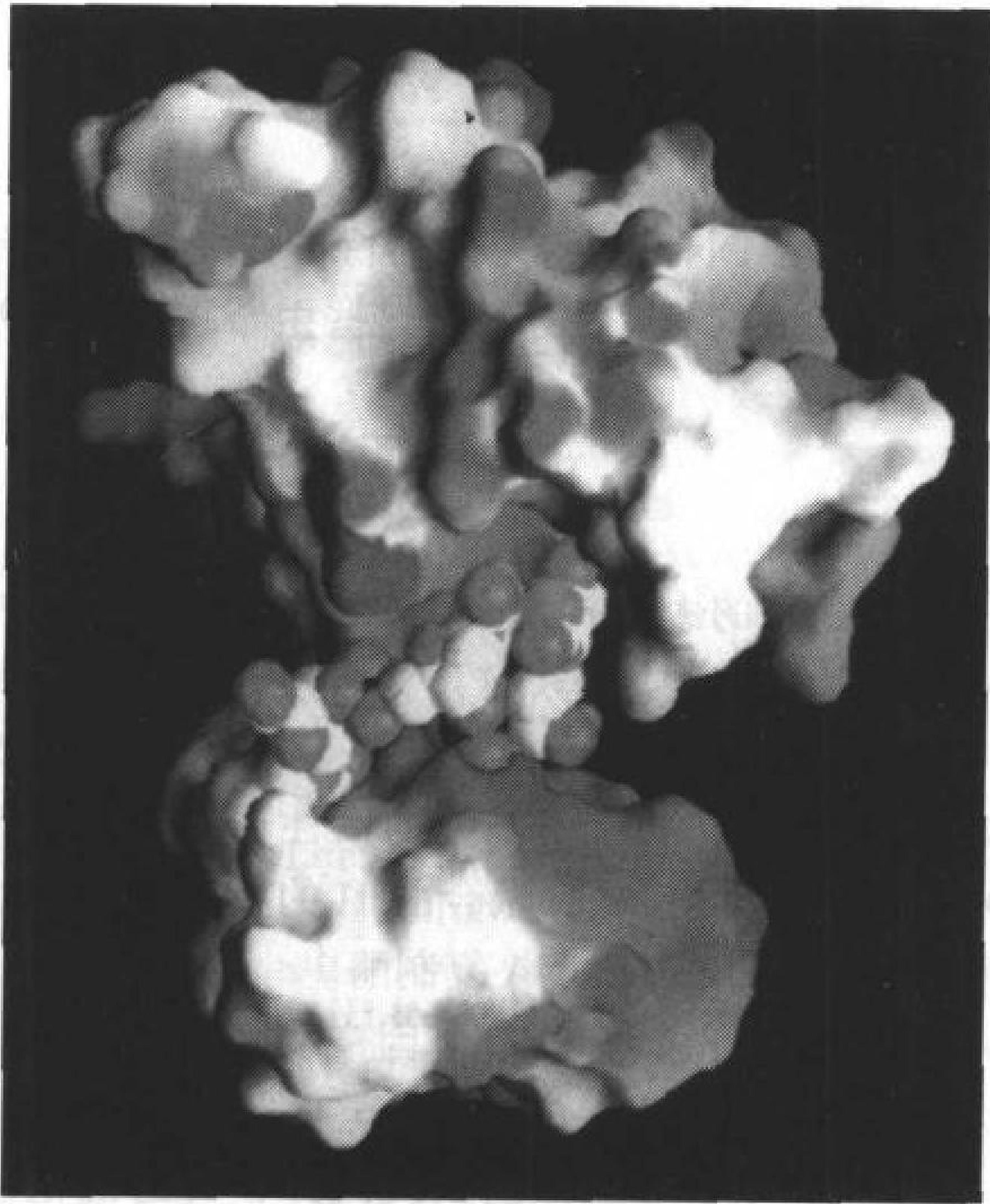


图 24-11 SSB 和 DNA 复合物的 X 射线结构

图像显示 T4 噬菌体 SSB(gp32)DNA 结合核心的溶液可及表面，按照静电势着色(蓝色正电；红色为负电；白色为中性)。由 $(dT)_4$(结合的六脱氧核苷酸的其余两个核苷酸在该 X 射线结构中看不见)表示的单链 DNA 以空间填充形式显示:C 为黄色，O 为红色、N 为绿色以及 P 黑色。该蛋白质通过与磷酸骨架的静电相互作用与 DNA 结合，而碱基则与蛋白质表面的疏水口袋接触。(经耶鲁大学 Thomas Steitz 允许转载此图)

B. 复制的起始

表 24-2 DNA 聚合酶 III 全酶的组成

亚基	分子质量/kDa	结构基因
α	130	*polC*(*dnaE*)
ε	27.5	*dnaQ*
θ	10	*holE*
τ	71	*dnaX*[a]
γ	45.4	*dnaX*[a]
δ	35	*holA*
δ′	33	*holB*
χ	15	*holC*
ψ	12	*holD*
β	40.6	*dnaN*

[a] γ 和 τ 亚基由同一个基因序列编码；γ 亚基对应于 τ 亚基的氨基末端。

引自:Kornberg, A. and Baker, T.A., DNA Replication(2nd ed.), P.169, Freeman(1992). and Baker, T.A. and Wickner, S.H., Annu. Rev. Genet. 26, 450(1992)。

具有 4.6×10^6 碱基对的大肠杆菌染色体的复制起始于一个 245 碱基对区域，此区域被称为 ***oriC*** 基因座，这段序列的组成在革兰氏阴性菌中高度保守。一个由多达 30 个 52kDa 的 **DnaA 蛋白**亚单位组成的复合物与 *oriC* 相结合，并引起该 DNA 的一部分熔解开放。这一熔解过程需要 ATP 的水解，这一 DNA 片段富含 AT 的特性可能有助于熔解过程。

六聚体 **DnaB 蛋白**，即一种所谓的**解旋酶**，以依赖 ATP 的方式从两个方向进一步解开 DNA 链。这一解链作用产生正超螺旋，它在某种程度上可以被天然存在的负超螺旋所抵消。然而，在复制叉处的连续解链，要求 DNA 回旋酶(一种 II 型拓扑异构酶；节 23-1C)的作用以产生额外的负超螺旋。

在前进中的回旋酶后面被分开的 DNA 链，通过**单链结合蛋白**(SSB)的结合而被阻止退火。SSB 是一种四聚体蛋白，它包裹着单链 DNA，从而使其维持在不配对状态。DNA 在被复制之前必须剥去 SSB。

由 T4 噬菌体编码的被称为 **gp32**(gp 代表基因产物)的 SSB 和一个六脱氧核苷酸所形成的复合物，即 DNA 结合核心的 X 射线结构表明：该蛋白质具有一个很深的带正电荷的裂隙(图 24-

780

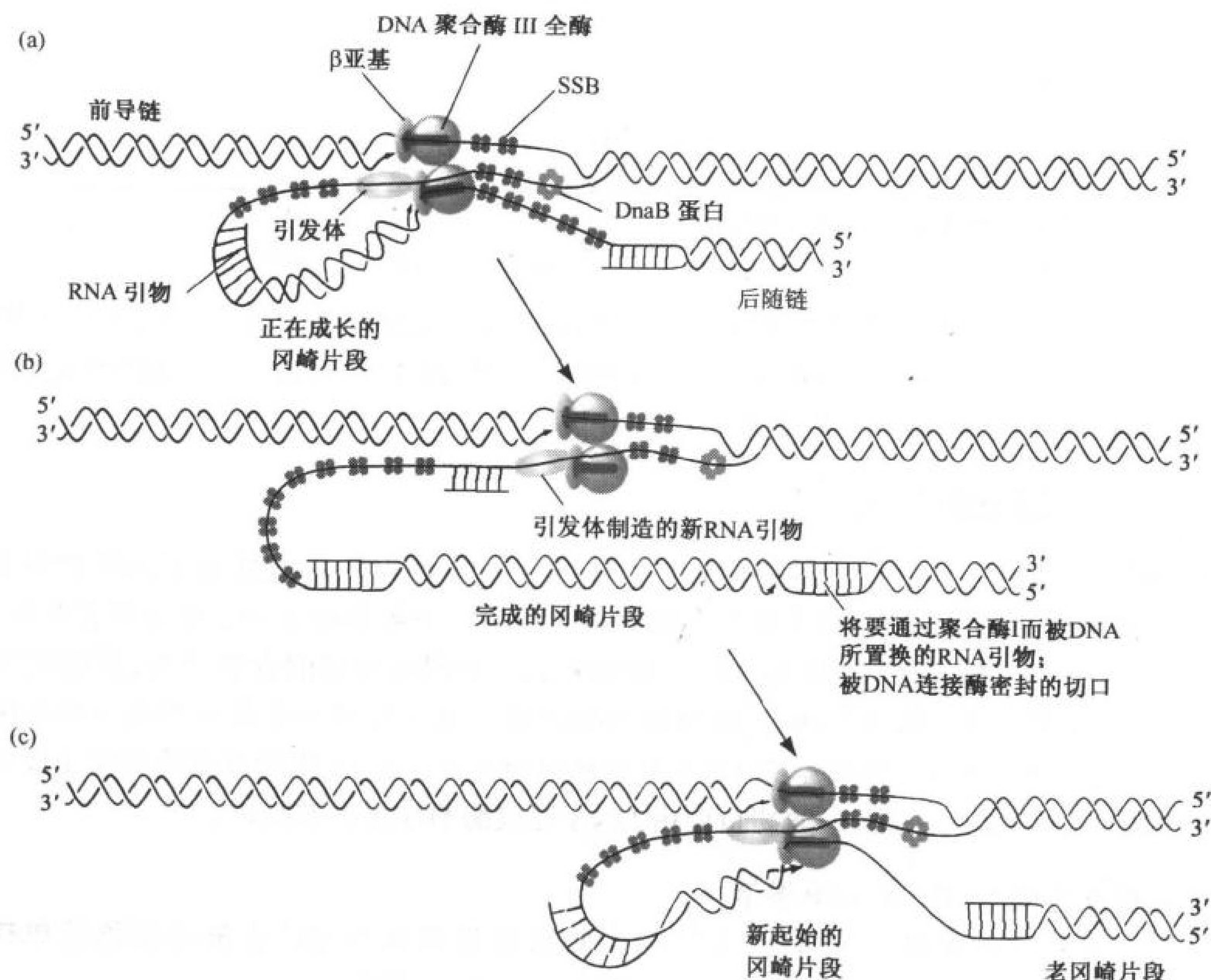


图 24-12　*功能的秘诀*：大肠杆菌 DNA 的复制

(a)含有两个 DNA 聚合酶 III 全酶的复制体合成前导链和后随链。后随链模板必须绕成环状，以便全酶延伸被引发的后随链。(b)全酶遇到先前已合成好的冈崎片段时，释放出后随链模板。这可能发出信号给引物体，起始合成一条后随链 RNA 引物。(c)全酶重新结合后随链模板，并延伸 RNA 引物以形成一个新的冈崎片段。请注意，在这个模型中，前导链的合成总是先于后随链的合成。

11),DNA 在此结合。这个裂隙的中央部分只有 15Å,这解释了 gp32 对双螺旋 DNA 的低亲和性(B 型 DNA 的直径约 20Å)。

引物体

所有的 DNA 合成,不管是前导链还是后随链,都需要预先合成一段 RNA 引物。大肠杆菌中的引物合成是由一个叫做**引物体**(primosome)的约 600kDa 的蛋白质组装所介导的(表 24-3)。这个复合物包括解旋酶(DnaB)和引物酶(DnaG)。引物体由 **PriA** 和 DnaB 催化的 ATP 水解所驱动,沿后随链的 DNA 模板按 5′→3′方向(也就是朝复制叉方向)移动。这一运动所经之处的 SSB 被置换,方向上与 DNA 链合成过程中模板的阅读方向相反。因此,引物体要短暂地调转其移动方向,让引物酶沿 5′→3′方向合成 RNA 引物(图 24-6)。

表 24-3 引物体的蛋白质[a]

蛋白质	亚基结构	亚基分子质量/kDa
PriA	单体	76
PriB	二聚体	11.5
PriC	单体	23
DnaT	三聚体	22
DnaB	六聚体	50
DnaC	单体	29
引物酶(DnaG)	单体	60

[a] 除引物酶之外,所有引物体蛋白质的复合物被称为前引物体。

引自:Kornberg, A. and Baker, T. A., DNA Replication(2nd ed.), pp. 286~288, Freeman(1992)。

每条冈崎片段都需要由引物体来起始。引发前导链合成的单独 RNA 片段,可由引物酶或 RNA 聚合酶(从一个 DNA 模板合成 RNA 转录物的酶;节 24-1)来合成,至少在体外是这样,但是当两种酶都存在时,其合成速度大增。

C. 前导链和后随链的合成

Pol III 全酶催化前导链和后随链的合成。这发生在含有两个 Pol III 分子的单个多蛋白质颗粒上,即**复制体**(replisome)。*为了使复制体作为单独的一个单位按 5′→3′方向沿前导链移动,后随链的模板必须回转成环状*(图 24-12)。在完成了一个冈崎片段的合成之后,后随链全酶重新定位于复制叉附近的一段新引物上,并重新开始合成。*这一过程的结果是形成一段连续的前导链和一系列被单链切口分隔的带有 RNA 引物的冈崎片段。*RNA 引物通过聚合酶 I 催化的缺口平移而被 DNA 置换,后随链中的切口则由 DNA 连接酶的作用而被封口。

781

DNA 连接酶反应被 NAD^+ 或 ATP 激活

DNA 连接酶反应所需的自由能,不同的生物或通过偶联 NAD^+ 水解为**烟酰胺单核苷酸**(NMN^+)和 AMP 或通过偶联 ATP 水解为焦磷酸和 AMP 而获得。

大肠杆菌 DNA 连接酶是一个 77kDa 的单体,利用 NAD^+ 催化一个 3 步反应(图 24-13):

782

1)NAD^+ 的腺苷酰基被转移到酶的一个赖氨酸残基的 ε-氨基上,从而形成一个不寻常的磷酰胺加合物;

2)活化酶的腺苷酰基被转移至切口的 5′磷酰基末端,从而形成一个腺苷酰化 DNA。此处,AMP 通过一个焦磷酸而不是通常的磷酸二酯键被连接到 5′核苷酸上;

3)DNA 连接酶催化 3′羟基对 5′磷酰基的进攻，生成磷酸二酯键，从而将缺口封闭并释放出 AMP。

需要 ATP 的 DNA 连接酶，例如真核生物的 DNA 连接酶，在反应的第一步释放出焦磷酸而不是 NMN^+。来自 T4 噬菌体的 DNA 连接酶值得注意，因为它能将两个没有互补的单链末端的双螺旋 DNA 连接到一起(平端连接)，这个反应给基因工程以很大方便(节 3-5)。

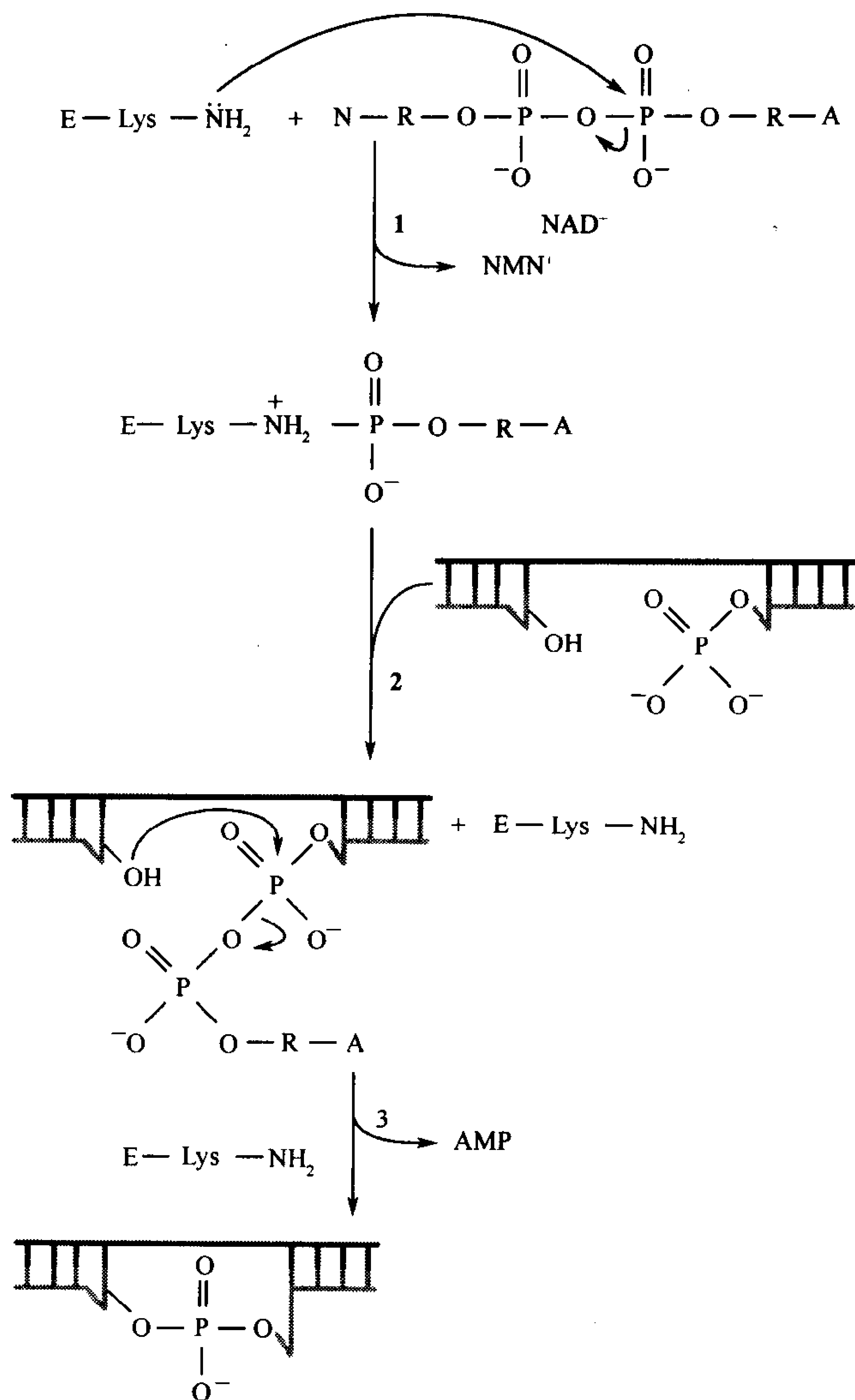


图 24-13　大肠杆菌 DNA 连接酶催化的反应

在真核生物或 T4 连接酶中，NAD^+ 被 ATP 代替，因此在第一步反应中是 PP_i，而不是 NMN^+ 被消除。此处 A、R 和 N 分别代表腺嘌呤、核糖和烟酰胺残基。

Pol III 的 β 亚基促进聚合的进行性

表 24-2 中列出的许多亚基都调节 Pol III 的聚合酶活性。例如，聚合酶 III 核心的进行性，只有聚合 10 到 15 个残基。然而，β 亚基将 Pol III 的聚合进行性提高到大于 5 000 个残基。结合在一个被切割的环状 DNA 上的 β 亚基，会滑向断裂处并离开，这一观察提示 β 亚基形成一个围绕 DNA 的闭合环或夹子。由 John Kuriyan 测定的 β 亚基的 X 射线结构(图 24-14)表明，它是一个“C”状单体的二聚体，这个二聚体形成一个约 80Å 直径的环形结构。中央约 35Å 直径的孔大于 B 型及 A 型 DNA 的 20Å 及 26Å 的直径(含有 RNA 引物和 DNA 的杂合螺旋具有类似 A 型 DNA 的构象；节 23-1A)。每个 β 单体形成结构相似的 3 个结构域，因此二聚体环是一个准对称的六角星。静电计算表明环的内表面带正电，而它的外表面则带负电。

建立 B 型 DNA 螺旋穿过中央孔(图 24-14)的模型研究表明，该蛋白质的 α 螺旋跨越 DNA 的大沟和小沟，不同于螺旋－转角－螺旋模体识别 DNA 那样进入其中(节 23-4B)。β 亚基的设计似乎尽量降低它和 DNA 的结合。这大概是为了允许该蛋白质沿 DNA 螺旋自由地滑动。

大肠杆菌 DNA 以每秒约 1000 核苷酸的速度被复制。因此，在后随链的合成中，DNA 聚合酶全酶每隔 1～2s 必须在模板链上再装载(冈崎片段长为 1000～2000 核苷酸)。这就要求促进 Pol III 进行性的 β 夹被迅速地打开和重新关闭。Pol III 全酶(亚基组成的 $\gamma_2\delta\delta'\chi\psi$)也被称为**夹**

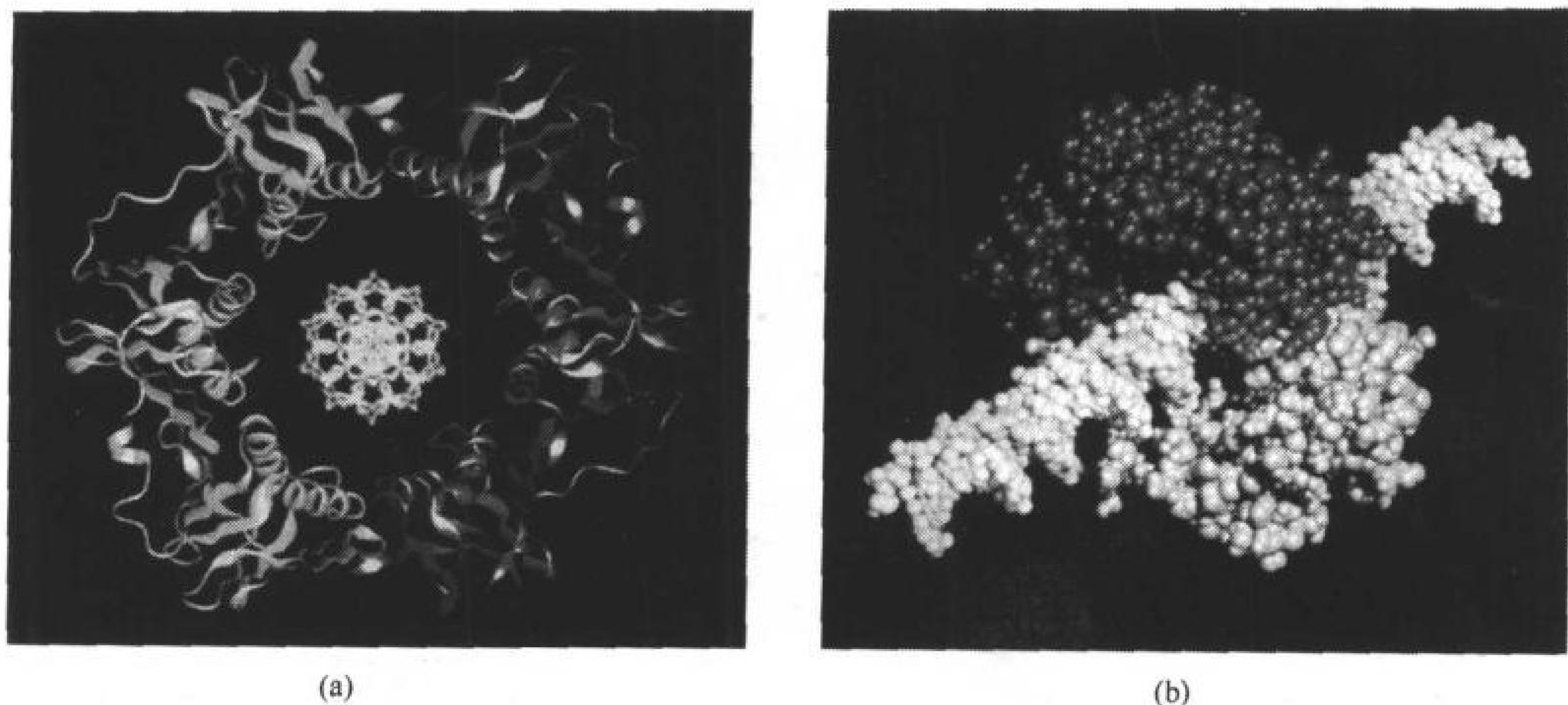


图 24-14 大肠杆菌 Pol III 全酶的 β 亚基的 X 射线结构
(a)沿二聚体的二重轴看该二聚体蛋白质的两个单体亚基的带状图，两个单体分别为黄色和红色。一个 B 型 DNA 的棒状模型被放在其螺旋轴与蛋白质二聚体的二重轴重合的位置。(b) 该蛋白质的空间填充模型，颜色表示同(a)蛋白质和设想的 B-DNA(青色)形成复合物。(经 Rockefeller 大学 John Kuriyan 允许转载此图)

子装载手(*Clamp Loader*)，因为它以一种依赖 ATP 的方式打开 β 夹，将其装载到 DNA 模板上。一旦 β 夹被装载到 DNA 上，Pol III 核心与 β 夹的结合就比和 **γ 复合物**更加牢固，因而将其置换并允许开始进行性 DNA 复制。当聚合酶碰到先前合成的冈崎片段时，Pol III 核心释放 DNA，并失去对 β 夹的亲和性，从而 γ 复合物进入 β 夹，后者从 DNA 上被卸下。γ 亚基和 Pol III 核心随即能够迅速起始一个新的冈崎片段的合成，因为它们通过和前导链合成的 Pol III 核心的连接而被固定在后随链模板的附近。

783

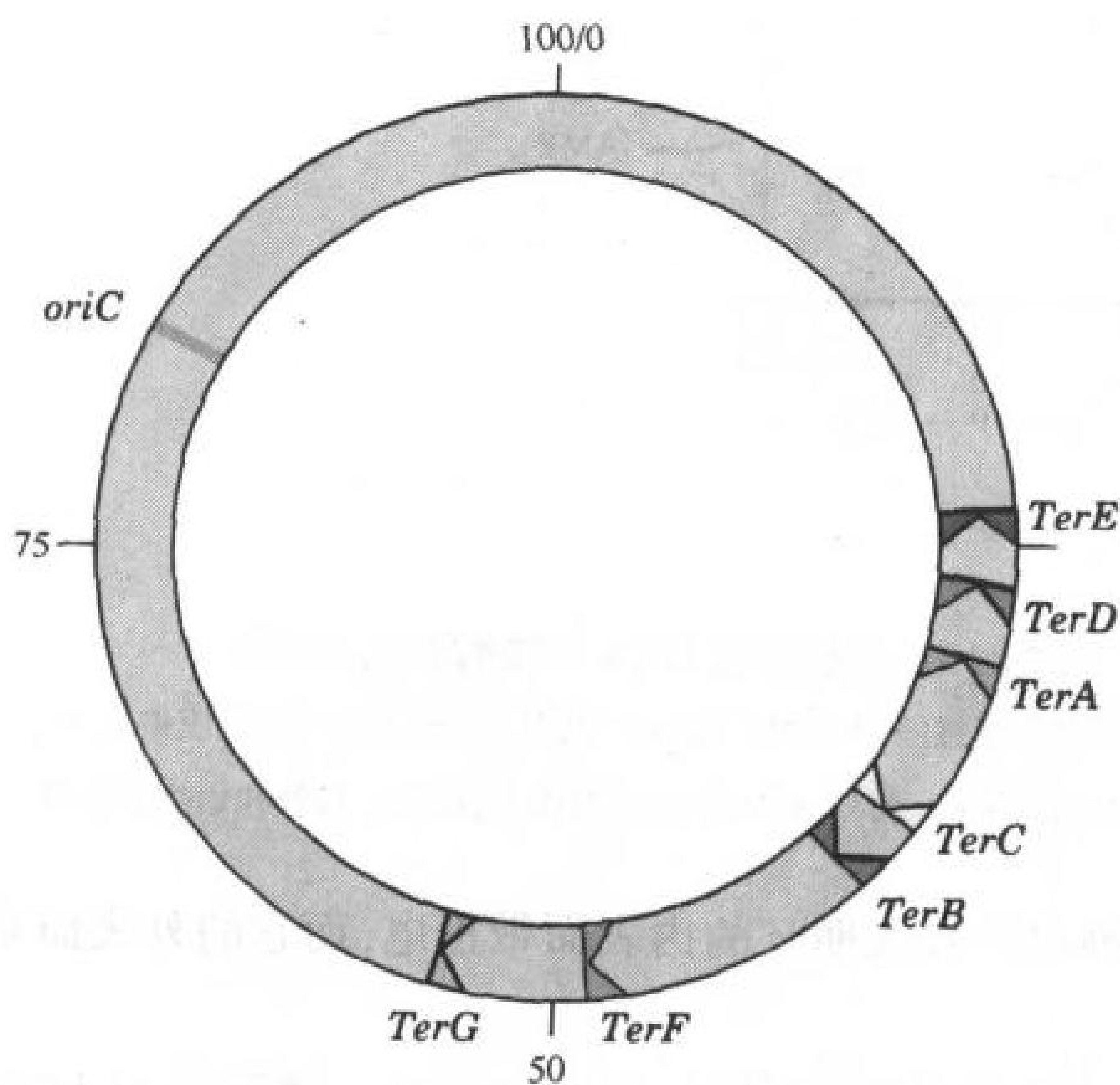


图 24-15 显示 *Ter* 位点位置的大肠杆菌染色体图谱
TerC、*TerB*、*TerF* 和 *TerG* 位点和 *TUS* 蛋白一起，允许一个逆时针方向运动的复制体通过，而不允许顺时针方向运动的复制体通过的。*TerA*、*TerD* 和 *TerE* 位点与此相反。结果，在 *oriC* 起始的双向 *DNA* 复制的两个复制叉将在 *oriC* 面对的 *Ter* 位点之间会合。

D. 复制的终止

大肠杆菌复制末端是一个大区域(350kb)，两侧有 7 个几乎相同的非回文对称终止子，约 23bp，其中 *TerE*、*TerD* 和 *TerA* 在一侧，而 *TerG*、*TerF*、*TerB* 和 *TerC* 位于另一侧(图 24-15；注意 *oriC* 在大肠杆菌染色体上正对着终止区域)。如图 24-15 所示，一个沿逆时针方向移动的复制叉通过 *TerG*、*TerF*、*TerB* 和 *TerC*，但在碰到 *TerA*、*TerD* 或 *TerE* 时便停下来(*TerD* 和 *TerE* 很可能是 *TerA* 的候补位点)。与此类似，一个沿顺时针方向移动的复制叉通过

TerE、*TerD* 和 *TerA*，但停止于 *TerC*，如果失败的话将停止于 *TerB*、*TerF* 或 *TerG*。因此，这些终止位点是有极性的；它们作为单向阀允许复制叉进入末端区域，但不能离开。这样的安排保证了在 *oriC* 处从双向起始产生的两个复制叉将在复制末端会合，即使其中一个远比另一个先到达那里。

复制叉在 Ter 位点的制动需要 **Tus 蛋白**的作用，这是一个 *tus* 基因（*tus* 代表终止子利用物质）的产物，具有 309 个残基的单体。Tus 蛋白特异性地与一个 Ter 位点结合，在结合处它阻止由 DnaB 解旋酶所进行的链置换，从而制止复制叉的前进。

784

Tus 和一个 15 碱基对的 Ter 片段复合物的 X 射线结构（图 24-16）表明，该蛋白质和 DNA 的结合处形成一个很深的带正电的裂隙。在 Tus 结合处，允许复制叉通过的一个 5 碱基对 DNA 片段变形，相对于典型的（正常的）DNA 其大沟变深，而小沟显著扩张。位于裂隙底部的蛋白质侧链穿过 DNA 变深了的大沟，从而产生序列特异性接触，使得蛋白质在没有一个大的构象改变的情况下，不能释放所结合的 DNA。然而，Tus 阻碍复制叉在 Ter 位点一侧前进，但不阻止另一侧前进的机制尚不清楚。

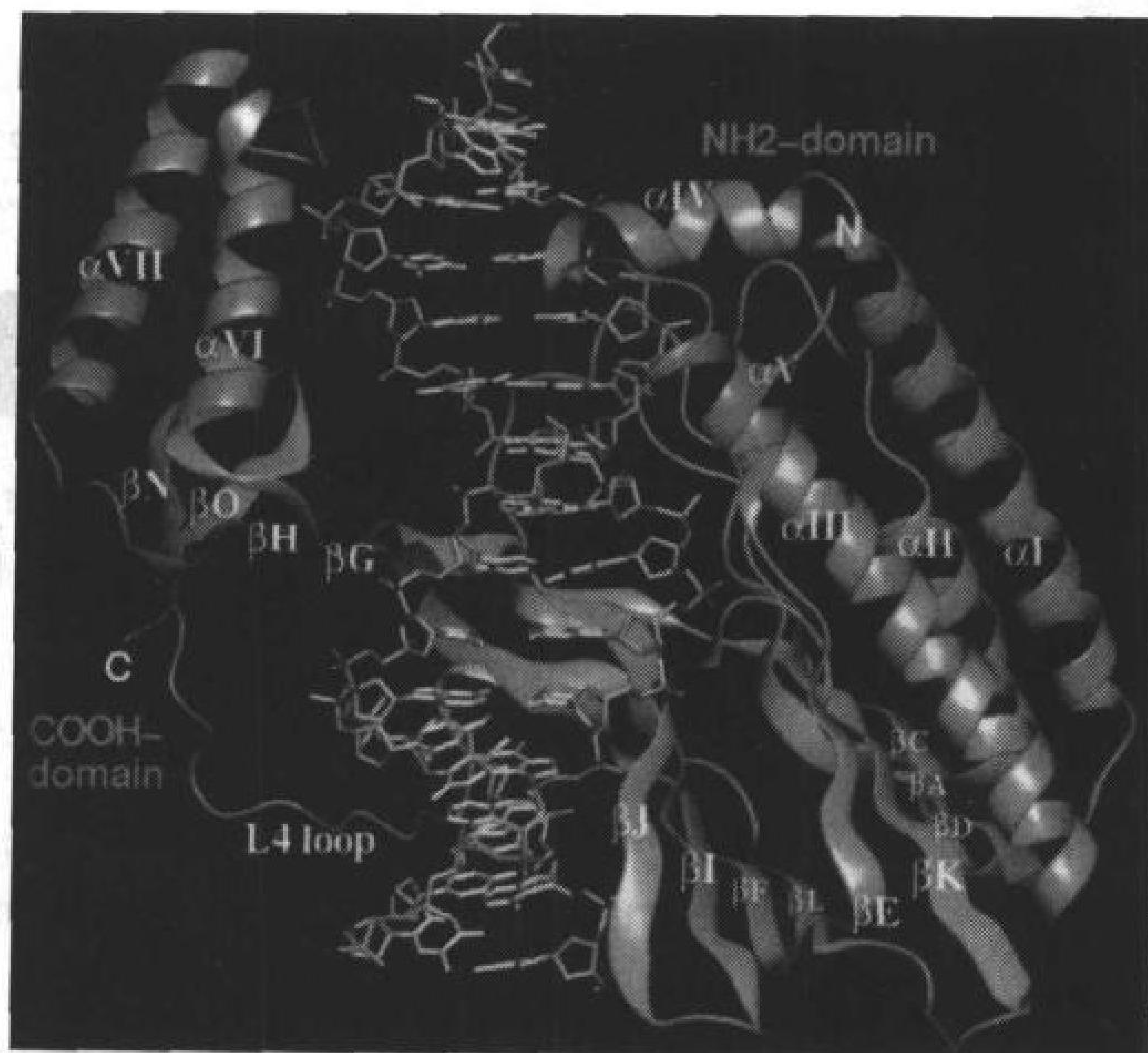


图 24-16　大肠杆菌 Tus 和含有 Ter 的 15 个碱基对 DNA 的复合物的 X 射线结构

该蛋白质以带状形式显示，其 N 和 C 端结构域的颜色为绿和蓝。DNA 以棒状形式表示，其碱基为黄色，糖－磷酸骨架为金色。［引自 Kamada, K., Horiuchi, T., Ohsumi, K., Shimamoto, N., and Morikawa, K., Nature 383, 599(1996)］

大肠杆菌 DNA 复制的最后步骤是连接的亲代 DNA 链的拓扑学拆分，从而将两个复制产物分开。这一反应可能由一种或多种拓扑异构酶所催化。

E. 复制的忠实性

即然像聚合酶 I Klenow 片段如此小的单个多肽就能独立复制 DNA，为什么大肠杆菌还要保持一套多于 20 种复杂的、具有协同作用的蛋白质来复制它的染色体呢？答案显然是为了保证精确地传递遗传信息，以达到近乎完美的 DNA 复制的忠实性。

突变的大肠杆菌或 T4 噬菌体向野生型的回复率表明,每 $10^8 \sim 10^{10}$ 个被复制的碱基对中只有 1 个发生错配,这相当于每 1000 个细菌每代只有约一个错误,如此高的复制精度来自 4 个原因。

1)细胞通过在节 22-1C 和节 22-2C 所讨论的机制维持平衡的 dNTP 水平。这一点很重要,因为某一种异常高水平的 dNTP 更有可能被错误掺入,反之,一种低水平的 dNTP 更有可能被一种水平较高的 dNTP 所替代。

2)聚合酶反应本身具有超常的忠实性,因为它通过两阶段进行。首先,进来的 dNTP 与模板发生碱基配对,而酶处于一种开放的无催化活性的构象。聚合反应只有在聚合酶环绕新形成的碱基对以后才能进行,该碱基对将催化残基正确定位(诱导契合)。蛋白质的构象改变构成 dNTP 和模板之间进行正确的 Watson-Crick 碱基配对的双核查。

785

3)Pol I 和 Pol III 的 3′→5′外切核酸酶功能可以检测并消除由它们的聚合酶功能所造成的偶然的错误。

4)在所有细胞中都存在一套十分有效的酶系统,可修复新合成 DNA 中的残基错误,以及在 DNA 合成之后,通过化学的和(或)物理的侵害造成的损伤。我们将在节 24-5 中讨论这些 DNA 修复系统。

此外,DNA 聚合酶在没有引物时不能引发链延伸,这也提高了 DNA 复制的忠实性。由于碱基配对相互作用的协同性,因此一条链的最初几个核苷酸最可能被错配(节 23-2)。RNA 引物的使用消除了这一错误来源,因为 RNA 在允许更精确的碱基配对的条件下最终被 DNA 置换。

3. 真核生物 DNA 的复制

真核生物和原核生物的 DNA 复制机制非常相似,尽管真核系统要复杂得多。其他模式的 DNA 复制发生在线粒体和某些病毒以及细菌中(见框 24-1)。在本节,我们考虑与真核生物 DNA 复制的一些蛋白质,以及复制线状染色体末端所带来的挑战。

A. 真核生物的 DNA 聚合酶

动物细胞含有至少 5 种不同的 DNA 聚合酶,按照它们被发现的顺序依次被命名为 **DNA 聚合酶 α、β、γ、δ 和 ε**(表 24-4),它们的功能主要由对抑制剂的不同反应而被阐明。

表 24-4 动物 DNA 聚合酶的性质

	α	β	γ	δ	ε
位置	细胞核	细胞核	线粒体	细胞核	细胞核
分子质量/kDa	>250	36～38	160～300	170	256
抑制剂					
蚜栖菌素	强	无	无	强	强
双脱氧 NTP	无	强	强	弱	弱
N-乙基马来酰亚胺	强	无	强	强	强

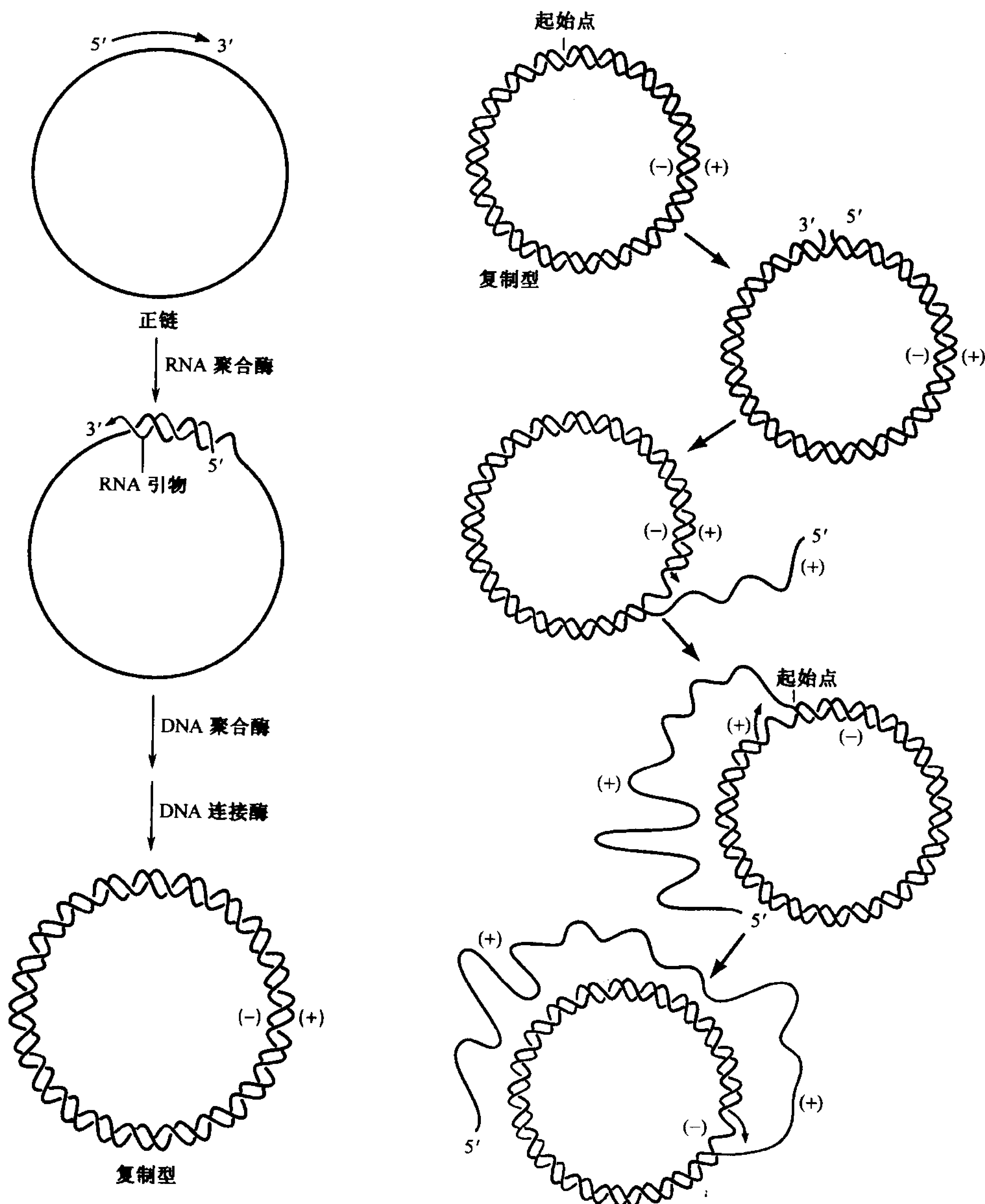
引自:Kornberg, A. and Baker, T.A., DNA Replication(2nd ed.), P.199, Freeman(1992)。

DNA 聚合酶 α 只存在于细胞核中,它参加染色体 DNA 的复制。这种多亚基蛋白质(在果蝇中有 4 种亚基;在大鼠肝脏中有 5 种),和所有 DNA 聚合酶一样,在单链 DNA 模板的指导下,通过由 5′→3′方向延伸引物来复制 DNA。DNA 聚合酶 α 具有牢固伴随的引物酶活性,但是,它缺少外切核酸酶活性,因此它复制出的 DNA 必须通过其他手段校对。

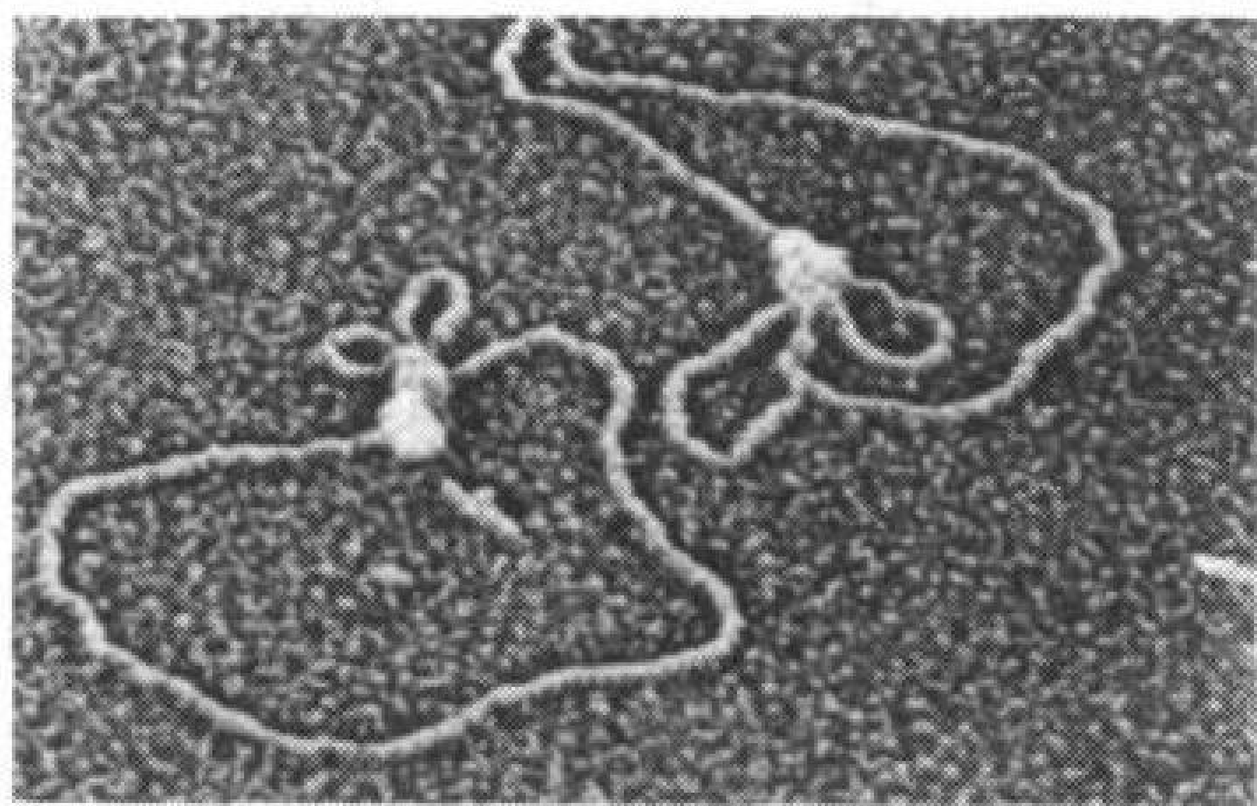
框 24-1　生物化学焦点

DNA 复制的其他模式

尽管许多病毒和细菌的基因组通过发生在大肠杆菌和真核生物中的前导链-后随链机制被复制，较小的环状染色体也能通过其他方式被复制。例如，某些噬菌体含有一条单链环状 DNA，即正(+)链，它可以作为模板，以类似常规的前导链的合成机制，合成互补负(−)链，从而形成一个被称为复制型(见左)的环状双螺旋 DNA。额外的正(+)链拷贝可以随后通过滚环或 σ 复制模式而被合成(之所以这样命名是因为复制结构象小写希腊字母 sigma)。这一过程起始于(+)链上的一个单链断裂点并利用(−)链作为模板(见右)。随着新(+)链被合成，它置换已存在的(+)链。多轮滚环复制可以产生大量串联排列的(+)链，它们随后被内切核酸酶分开，以便包装到单个噬菌体颗粒中。

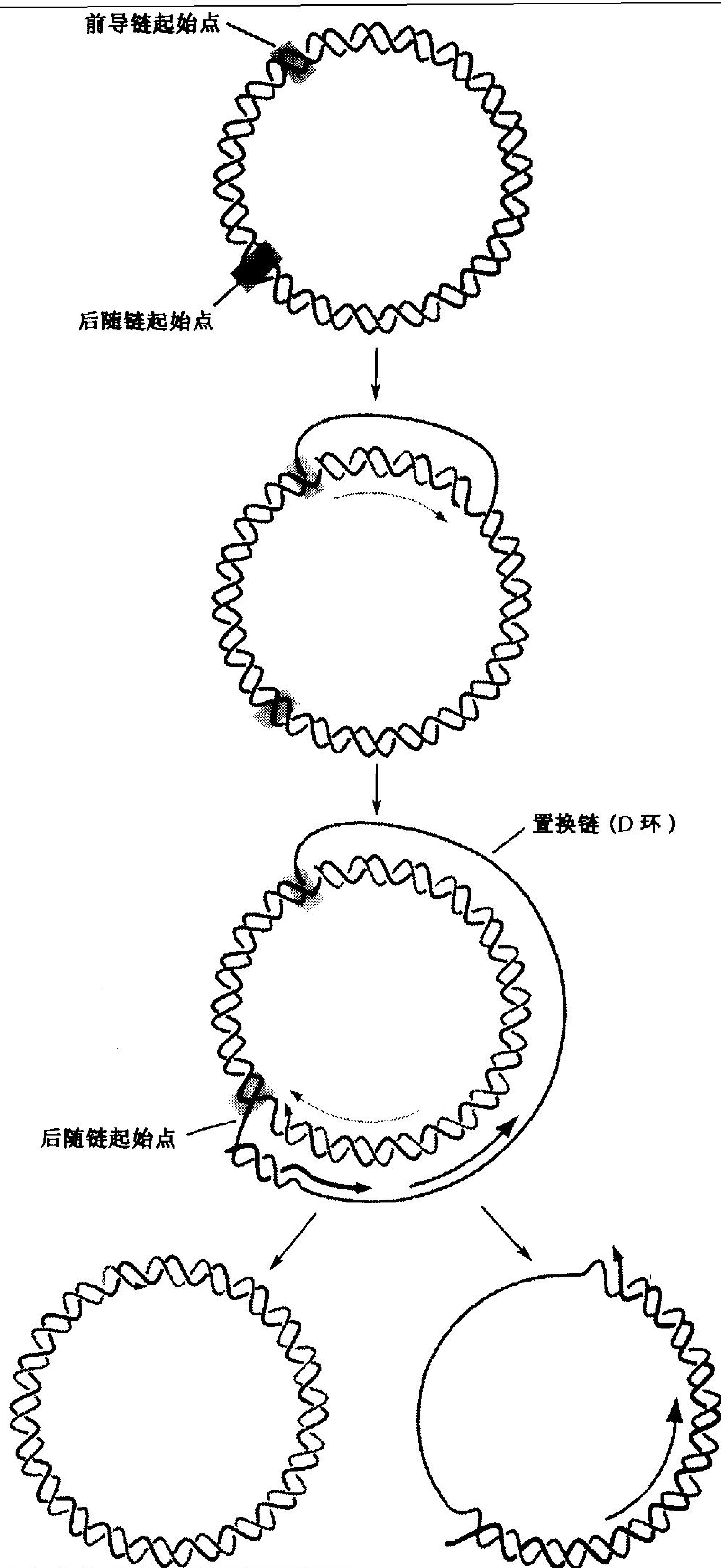


具有 5386 个核苷酸单链的 **ΦX174 噬菌体**的复制从负(－)链的合成开始，产生一个双链复制形式。这个过程需要和一个约 600kDa 的引物体结合。引物体-DNA 复合物的特征是有 1 个或 2 个伴随的 DNA 小环(见下图)，复合物保持完整以进行正链合成。



(电子显微照片由 North Carolina 大学 Jack Griffith 提供)

线粒体 DNA 通过一种前导链合成先于后随链合成的过程而被复制。因此前导链置换后随链模板而形成一个**置换**或 **D 环**(见右图)。哺乳动物的 15kb 环状线粒体的染色体通常含有一个 500～600 核苷酸的 D 环，D 环经历多轮降解和重新合成。在复制过程中，D 环被延伸。当 D 环围绕染色体到达约 2/3 的一点时，后随链原点被暴露，其合成沿相反的方向绕染色体进行。因此当前导链合成终止时，后随链合成只完成了约1/3。



DNA 聚合酶 δ 是一种细胞核酶，它的抑制剂敏感性与 DNA 聚合酶 α 相似(表 24-4)，缺少与之伴随的引物酶活性，但具有 3′→5′外切核酸酶校对活性。此外，DNA 聚合酶 α 只表现出中等进行性(约 100 核苷酸)，而 DNA 聚合酶 δ 实际上具有无限的进行性(它可复制模板的全长)，但只是在和一种被称为**增殖细胞核抗原**(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)的蛋白质形成复

合物时。因此看来 DNA 聚合酶 δ 和 PCNA 形成的复合物是真核生物前导链的复制酶(它需要高进行性,但只偶尔需要引物),而 DNA 聚合酶 α 则是后随链复制酶(它需要频繁引发,但只需 100 到 200 核苷酸的进行性)。

261 个残基的 PCNA 的氨基酸序列与大肠杆菌 Pol III 全酶的 366 个残基的 β 亚基只有很弱的同源性(节 24-2C)。然而,PCNA 的晶体结构显示,它形成一个围绕 DNA 的三聚体环,在结构上与二聚体 β 夹子几乎一样(图 24-17)。

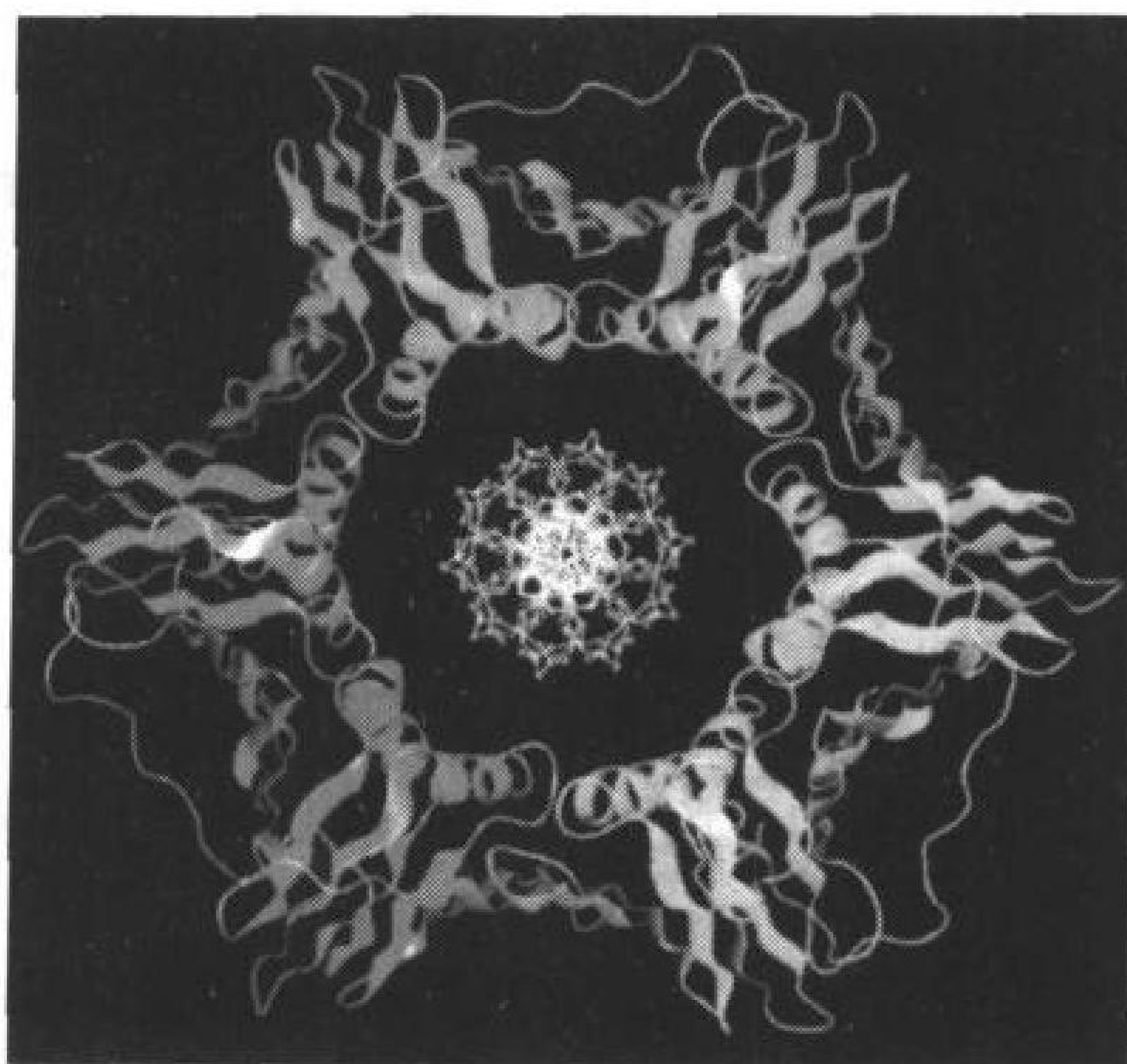


图 24-17　PCNA 的 X 射线结构

3 个蛋白质单体(红,绿和黄)形成一个三重对称的环状结构。一个双螺旋 B 型 DNA 的模型(沿其螺旋轴观看)被放在 PCNA 环中央的位置上。请将这个结构与大肠杆菌聚合酶 III 全酶的 β 亚基(图 24-14)作比较。

(经 Rockefeller 大学 Johu Kuriyan 允许转载此图)

DNA 聚合酶 ε,表面上很象 DNA 聚合酶 δ,不同之处在于 ε 即使没有 PCNA,照样有很高的进行性。DNA 聚合酶 ε 也有 3′→5′外切核酸酶活性,它将单链 DNA 降解为 6 到 7 个残基的寡

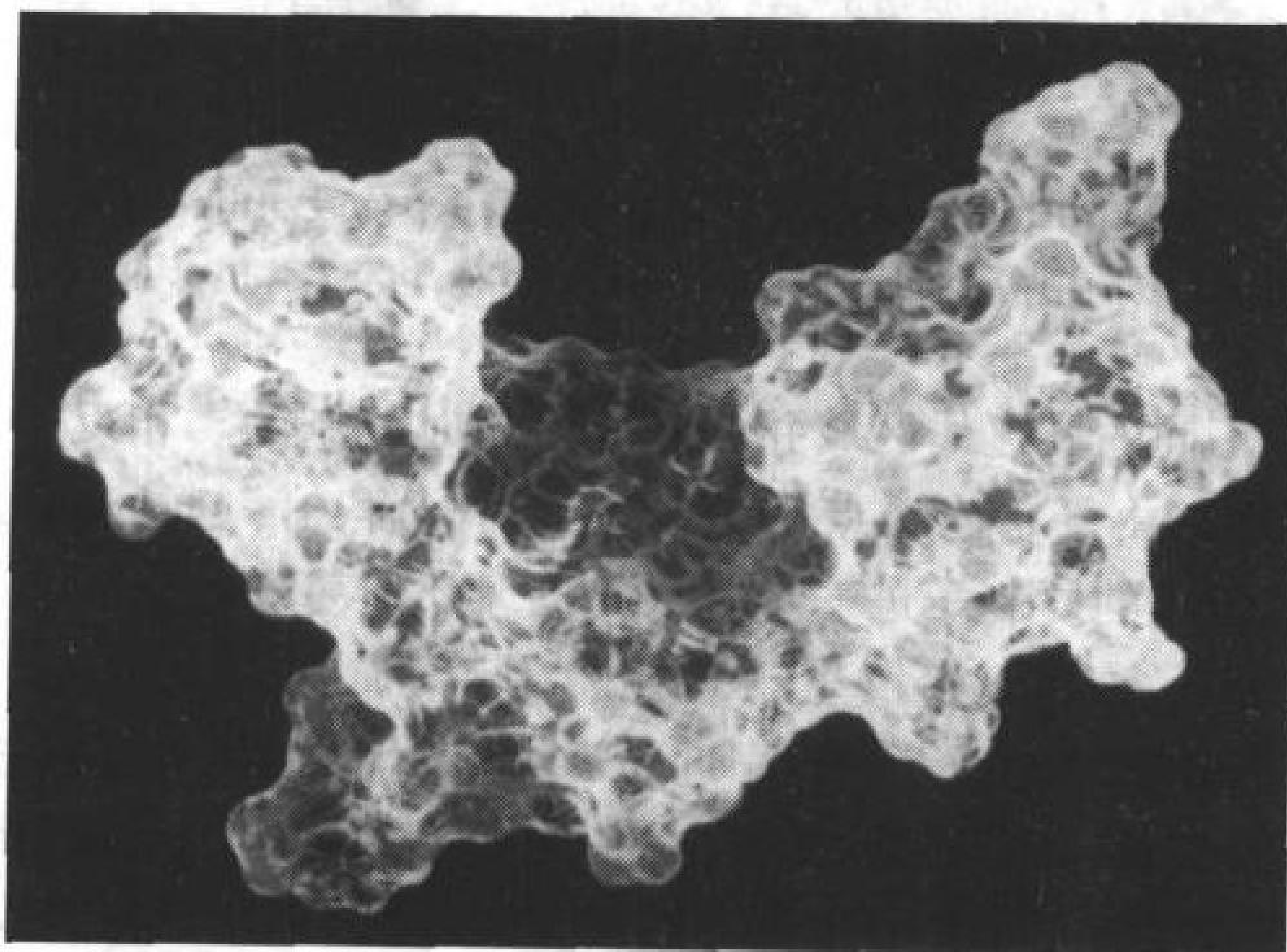


图 24-18　大鼠 DNA 聚合酶 β 的催化结构域的 X 射线结构

与其他 DNA 聚合酶类似,该蛋白质具有拇指手指以及手掌亚结构域,与其他 DNA 聚合酶类似,以其溶剂可及表面为准,蛋白质被定向为 N 末端手指亚结构域位于左上方。按照电荷表面的颜色红色为负电,蓝色为正电和白色为中性。推测 DNA 结合裂隙的强正电荷无疑有助于和多阴离子 DNA 的结合。(经加利福尼亚为 Agouron 制药厂 Zdenek Hostomsky 允许转载此图)

核苷酸,而不像 DNA 聚合酶 δ 的外切核酸酶活性那样将单链 DNA 降解成单核苷酸。DNA 聚合酶 ε 是修复紫外线诱发的 DNA 损伤所必需的,但它可能也是体内复制 DNA 所必需的。

DNA 聚合酶 β 的特殊之处在于其分子小(大鼠中为 335 个残基)。这个核酶的生物学功能

仍然未知,但它可能参与 DNA 修复。由 Zdenek Hostomsky 所测定的大鼠 DNA 聚合酶 β 的一段稳定的蛋白裂解片段(第 85～335 残基)的 X 射线结构(图 24-18)表明,此蛋白质和包括 Klenow 片段(图 24-10)在内的其他聚合酶一样,具有相同的 U 形,尽管它缺少严格的结构同源性。

789

DNA 聚合酶 γ 只存在于线粒体中,在此可能复制线粒体的染色体。叶绿体含有一个类似的酶。聚合酶蛋白家族的另一个成员是病毒的**反转录酶**(reverse transcriptase),即一种由 RNA 指导的 DNA 聚合酶(见框 24-2)。

B. 真核生物 DNA 复制的起始

DNA 聚合酶 α 以每秒约 50 个核苷酸的速度合成 DNA(比原核生物 DNA 聚合酶约慢 20 倍)。由于真核生物染色体通常含有比原核生物染色体多 60 倍的 DNA,若像在原核生物中那样,从单个起始点进行双向复制,将需要约一个月。然而,如图 24-19 电镜照片所示,*真核生物染色体含有多个起始点*,根据不同的物种和组织,每 3～300kb 碱基对就有 1 个起始点,所以复制在几小时内就可完成。

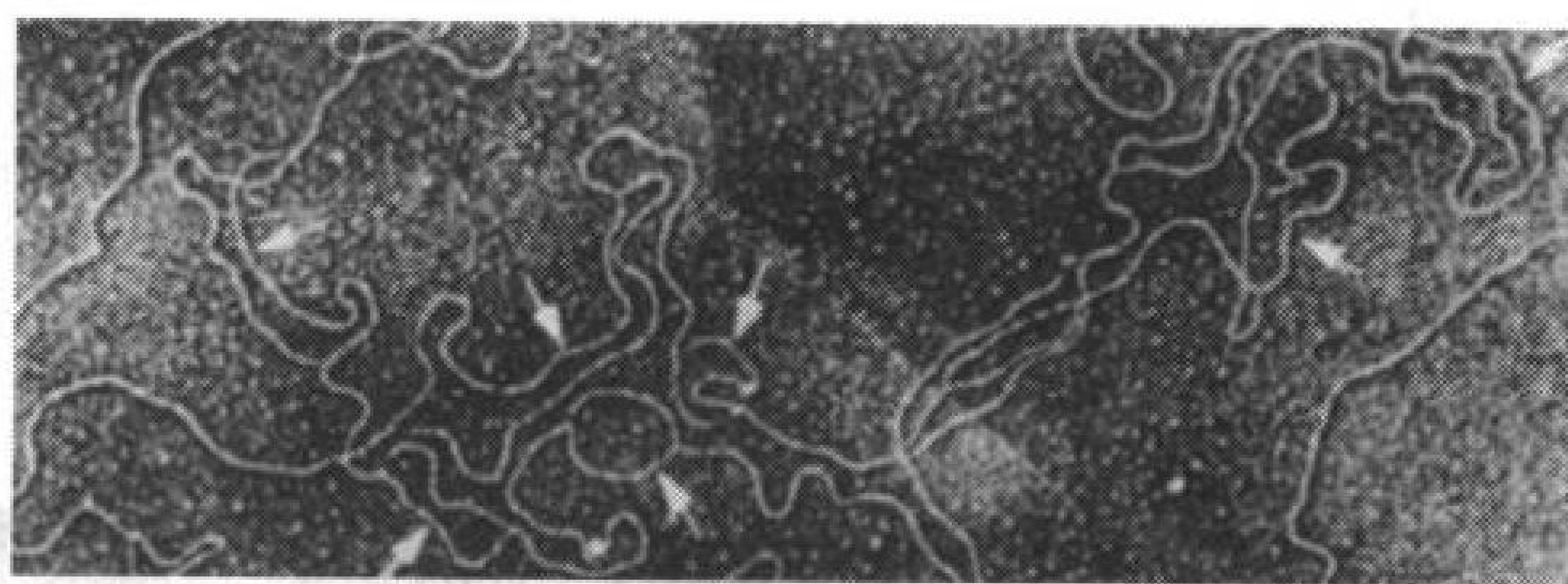


图 24-19 正在复制的果蝇 DNA 的一个片段的电镜照片

箭头所示为多复制眼。[引自 Kreigstein, H.J. and Hogness, D.S. Proc, Natl. Acad. Sci, 71, 136(1974)]

细胞学观察显示,不同的染色体区域并非完全是同时复制的。相反,一簇 20～80 个相邻**复制子**(replicon)(复制单位:由复制起始点控制的各 DNA 片段)一起被激活。依次激活不同的复制子,以及防止已被复制过的复制子进一步复制的机理都不甚清楚。

在酵母细胞中,DNA 复制起始发生于**自主复制序列**(autonomously replicating sequences, ARS),自主复制序列是保守的 11bp 序列,靠近易于解链的 DNA。如同原核生物,解旋酶是准备复制的 DNA 所必需的,然而,和原核生物 DNA 不同,真核生物 DNA 被包装于核小体中(节 23-5B)。这种结构的某些改变对于起始可能是必需的,然而复制一旦进行,核小体似乎不妨碍 DNA 聚合酶的前进。用标记的组蛋白进行的实验表明,紧靠复制叉前面的核小体解聚,而且游离的组蛋白马上与刚出现的子代双螺旋重新结合。亲代组蛋白随机地与前导及后随双螺旋结合。DNA 复制(发生在细胞核中)与细胞质中组蛋白的合成协同进行,因此总是有足够量新的组蛋白。

C. 端粒和端粒酶

线状染色体的末端给复制机器带来一个问题。具体地说,DNA *聚合酶不能合成后随链的最末端的 5′末端*(图 24-20)。即使一段 RNA 引物与 DNA 模板的 3′末端配对,它也不可能被 DNA 置换(记住 DNA 聚合酶只能由 5′→3′方向起作用;它只能延伸一个已经存在的引物,并且该引物必

须结合在其互补链上)。结果,在缺少一种用于完成后随链的机制的情况下,每过一轮复制,DNA 分子将在两端缩短一个 RNA 引物的长度。最终必将导致在染色体末端的必需遗传信息的丢失。 790

真核生物染色体的末端叫**端粒**(telomer)(希腊语中 telos 即 end),它具有一种不寻常的结构。端粒 DNA 在每个染色体末端的 3′末端链上含有 1000 或更多串联重复的富含 G 的短序列(在原生动物四膜虫中为 TTGGGG,在人中是 TTAGGG)。此外,该链具有一个 12~16 核苷酸的单链突出端。该 3′突出端可作为起始后随链上最后一个冈崎片段的引物的模板。

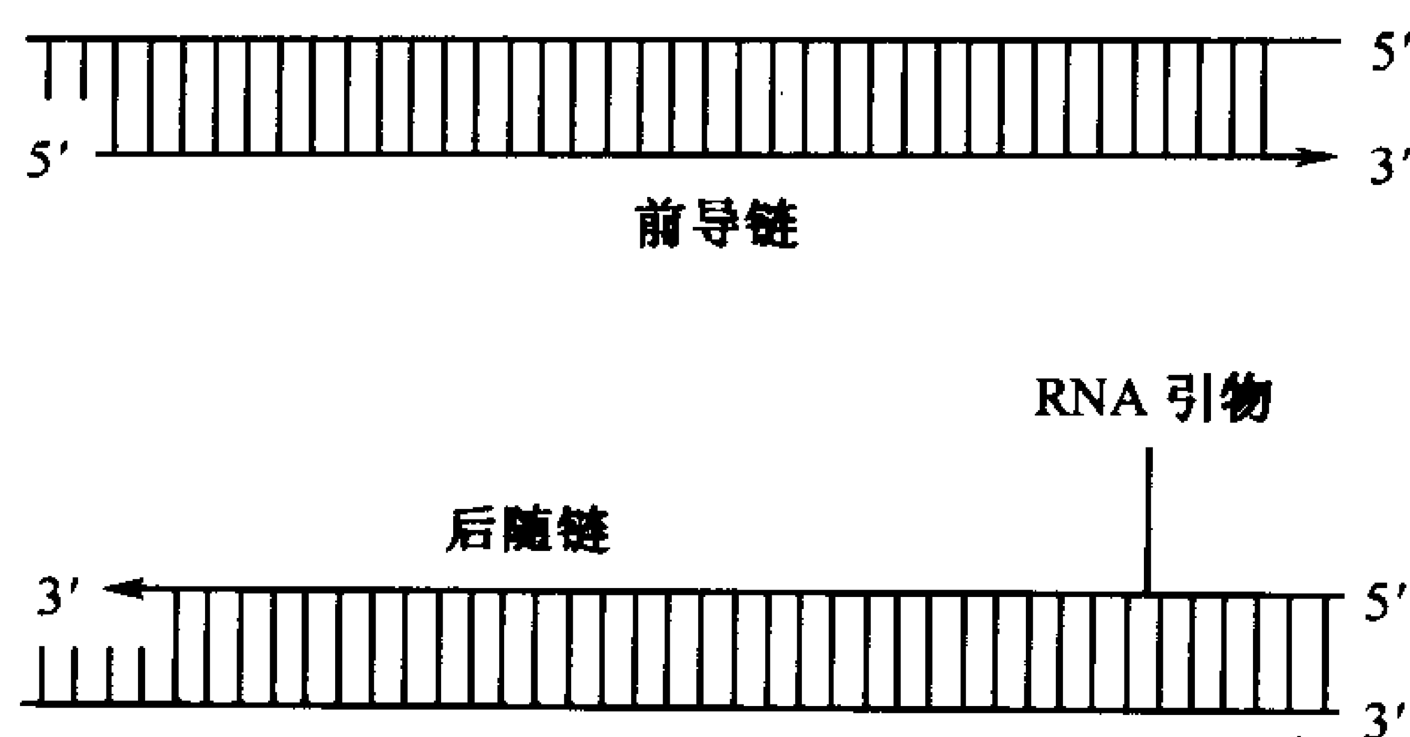


图 24-20 平端染色体的复制

前导链合成可进行至染色体的末端(上)。然而,DNA 聚合酶不能合成后随链的最后 5′末端,因为它只能延长一个与模板链(下)3′末端配对的 RNA 引物。引物的去除,以及剩余单链延伸的降解导致染色体每轮复制后就短一点。

791

Elizabeth Blackburn 证明端粒 DNA 由一种被称为**端粒酶**(telomerase)的酶所合成并维持。例如,四膜虫端粒酶可以独立地往任何外加模板的任何富含 G 的端粒寡核苷酸的 3′末端加上串联重复的端粒序列 TTGGGG。这一过程如何发生的一个线索来自端粒酶是**核糖核蛋白**(蛋白和 RNA 的复合物)这一发现,此核糖核蛋白的 RNA 成分含有与重复的端粒序列互补的一个片段。显然这个 RNA 是作为核苷酸被加到 DNA 3′末端这一反应的模板。因此端粒酶的作用类似于反转录酶(框 24-2);事实上,它的蛋白质成分与反转录酶是同源的。端粒酶不断地转位到 DNA 链的新的 3′末端上,从而在 DNA 上添加许多端粒序列(图 24-21)。与富含 G 的端粒链互补的 DNA 链显然是由合成后随链的正常细胞机器所合成的,这必然在富含 G 的链上留下一个 3′突出端。

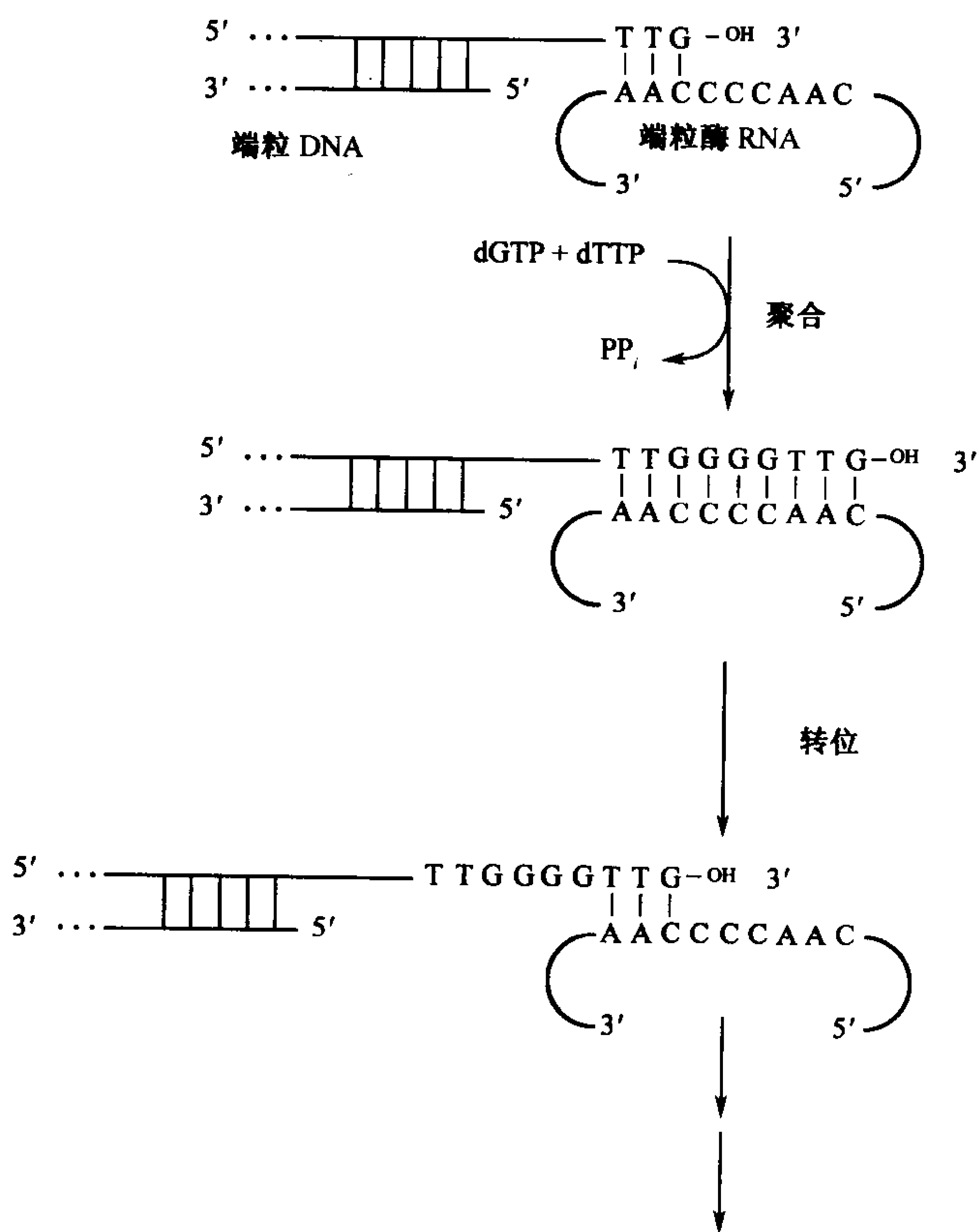
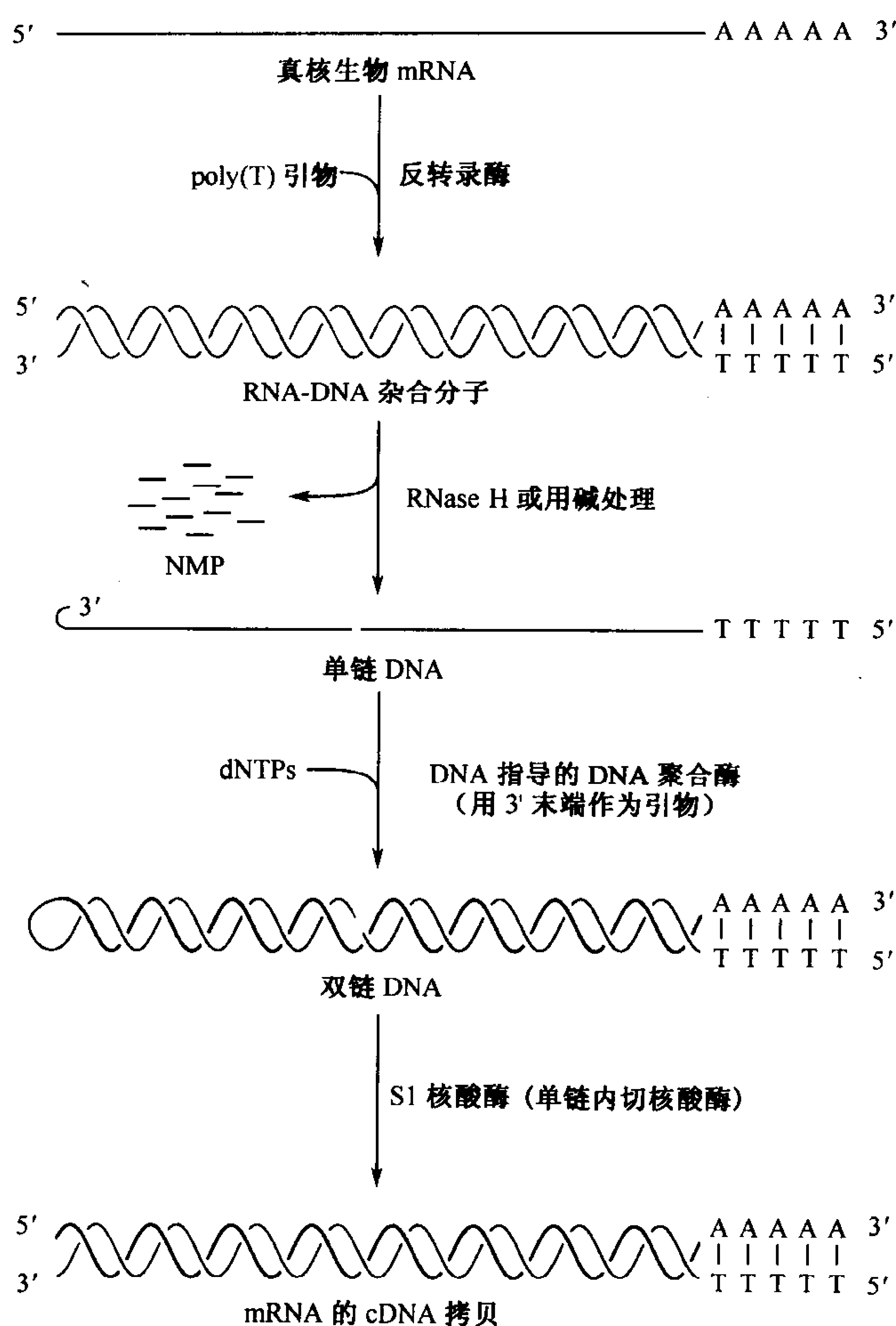


图 24-21 四膜虫端粒酶合成端粒 DNA 的推测机制

端粒的 5′结尾链随后通过正常的后随链合成方式被延长。[引自 Greider, C.W. and Blackburn, E.H., Nature 337, 336(1989)]

框 24-2　生物化学焦点

反转录酶

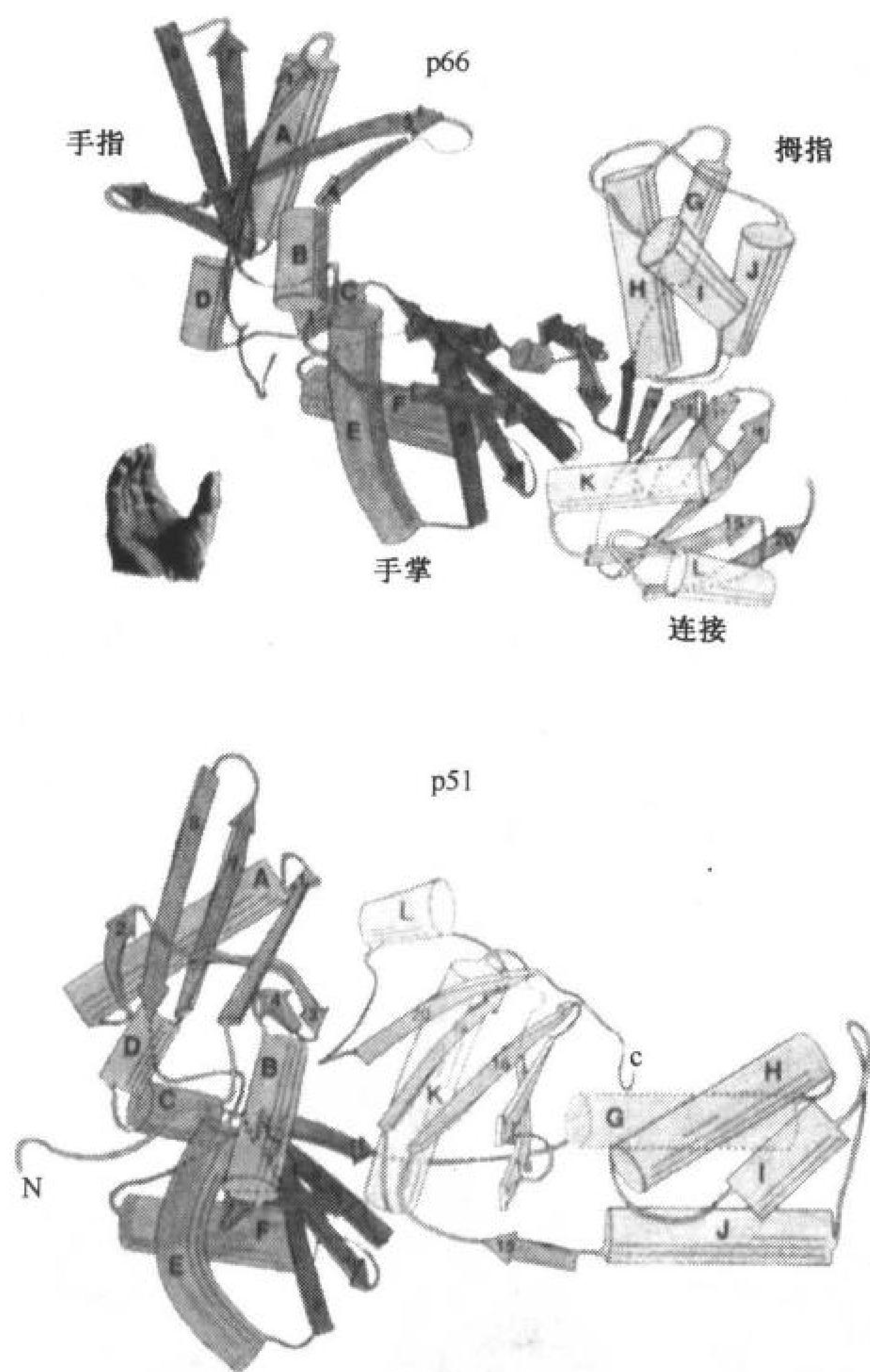


反转录酶(RT)是**反转录病毒**的一个必需的酶。反转录病毒是含 RNA 的真核病毒,例如**人免疫缺陷病毒**(HIV,获得性免疫缺损综合征即艾滋病的病原)。由 Howard Temin 和 David Baltimore 在 1970 年分别独立发现的反转录酶(RT),从一个 RNA 模板上沿 5′→3′方向合成 DNA。尽管该酶的活性最初被认为与分子生物学的中心法则对立(节 3-3B),但 RT 反应不存在任何热力学禁区(事实上在某种条件下,Pol I 可以拷贝 RNA 模板)。RT 催化病毒的单链 RNA 基因组向双链 DNA 转化的第一步。

病毒进入细胞后,其 RT 利用病毒 RNA 作为模板,合成一条互补 DNA 链,产生一个 RNA-DNA 杂合螺旋。DNA 合成由宿主细胞的 tRNA 引发,它的 3′末端去折叠,以便与一段互补的病毒 RNA 进行碱基配对。病毒的 RNA 链随后被 **RNase H**(一种水解 RNA-DNA 杂合螺旋中 RNA 的 RNA 酶)酶切降解。最后,DNA 链作为模板合成其互补 DNA,从而产生双链 DNA,然后整合进宿主细胞的染色体中。

RT 已成为基因工程中的一个特别有用的工具,因为它能将 mRNA 转录为互补 DNA 链(cDNA,右)例如在大肠杆菌中 cDNA 可用于表达真核生物的结构基因(节 3-5D)。因为大肠杆菌缺少剪除内含子的机制(节 25-3A),因此,在大肠杆菌中利用基因组 DNA 表达一个真核生物结构基因,需要事先切除其内含子——在技术上这是很困难的。

HIV-1 反转录酶是一个二聚体蛋白质,它的两个相同的 66kDa 多肽链,被称为 p66,每个 p66 都含有一个聚合酶结构域和一个 RNase H 结构域。可是,两个亚基的 RNase H 结构域其中一个被蛋白酶水解切除,从而产生一个叫 p51 的 51kDa 的多肽。因此,RT 是一个 p66 和 p51 的二聚体。



HIV-1 RT的X射线结构显示这两个亚基具有不同的结构，尽管每个亚基都含有手指、手掌、拇指以及一个"连接"结构域。p66亚基的RNase H结构域紧接连接结构域之后。p66和p51亚基并非二重分子对称的关系（一种罕见，但并非没有先例的现象），而是以一种头对尾排列的方式相结合。因此，RT只有一个聚合酶活性中心。

反转录酶缺少外切核酸酶校对功能，因而很容易出错。事实上，这正是HIV甚至具有在单个宿主中迅速演变能力的原因，是开发HIV疫苗的一个主要障碍。这种快速突变也是HIV能迅速对药物产生抗性的主要原因，包括抑制RT在内的病毒编码酶的药物。（RT的结构由Yale University的Thomas Steitz提供）

框24-3 健康和疾病的生物化学

端粒酶，衰老和癌症

没有端粒酶，染色体将随每次细胞分裂而变得越来越短，而且细胞的后代由于必需基因的丢失，最终将死亡。事实上，原本可以长生不老的四膜虫培养物，其端粒酶遭突变损伤后，就会在逐渐死亡之前变得像衰老的哺乳动物细胞。由于多细胞生物的体细胞实际上缺少端粒酶活性，这提示体细胞中端粒酶功能的丧失可能在衰老进程中起作用。

培养生长的哺乳动物体细胞，在到达衰老和死亡之前，只能进行有限次数的分裂（20～60次）。细胞培养的增殖能力和它的供体的龄长之间只存在微弱的相关性。但细胞培养的初始端粒长度与其增殖能力之间却存在很强的关联。开始具有相对较短端粒的细胞，与具有较长端粒的细胞相比，经历的倍增次数明显要少。此外，患有早老症（一种罕见疾病，特征是迅速及过早的衰老而导致幼年夭折）个体的成纤维细胞有较短的端粒，这一观察和它们在培养中增殖能力降低相一致。与此相反，精子（它们实际上是长生不老的）具有长度不随供体年龄而改变的端粒，这表明端粒酶在精细胞生长中保持活性。

同样,培养中少数变成长生不老的(能够无限增殖的)细胞表现出有活性的端粒酶和稳定长度的端粒,就像单细胞真核生物的细胞一样(它们也是长生不老的)。因此看来端粒的丢失是细胞老化进而衰老的一个重要原因。

那么多细胞生物体细胞中的端粒酶活性的丢失有何选择性优势呢?一种微妙的可能性是细胞衰老是一种防止多细胞生物癌变的机制。事实上,长生不老的并且生长失控的癌细胞含有活性的端粒酶。例如,该酶在卵巢癌细胞中有活性,但在正常卵巢组织中则没有。有趣的是,某些肿瘤中的端粒很短,可能这是因为细胞在已经开始不受控制地复制(并且因此消耗了它们大部分的端粒)之后才表达端粒酶。由于端粒酶明显地使甚至是很短的端粒保持稳定,因此端粒酶的抑制将最终导致端粒的完全丧失,进而导致细胞分裂的终结。该假说使端粒酶抑制剂成为开发抗肿瘤药物的一个诱人的靶(分子)。

富含鸟嘌呤的多核苷酸具有通过 Hoogsteen 型碱基配对(节 23-2B)而聚集的倾向。这一倾向允许富含 G 的端粒突出链自身往回折叠,形成发夹结构,两个这样的发夹结构聚集成一个四链结构(图 24-22a)。每条链的 G 残基以 **G-四套件**(G-quarter)的形式形成氢键排列(图 24-22b)。端粒酶十二聚体 d($G_4T_4G_4$)在溶液中的 NMR 结构不同于它的 X 射线晶体结构,其原因虽不清楚,但端粒四螺旋的形成,不论是哪种结构,都可能调节端粒酶的活性。端粒酶的缺失会导致染色体每经过一轮 DNA 复制后逐渐缩短,这也许对细胞的正常衰老起作用。相反地,增强端粒酶的活性可使复制和细胞生长不受控制(见框 24-3),这种情况见于癌症。

792

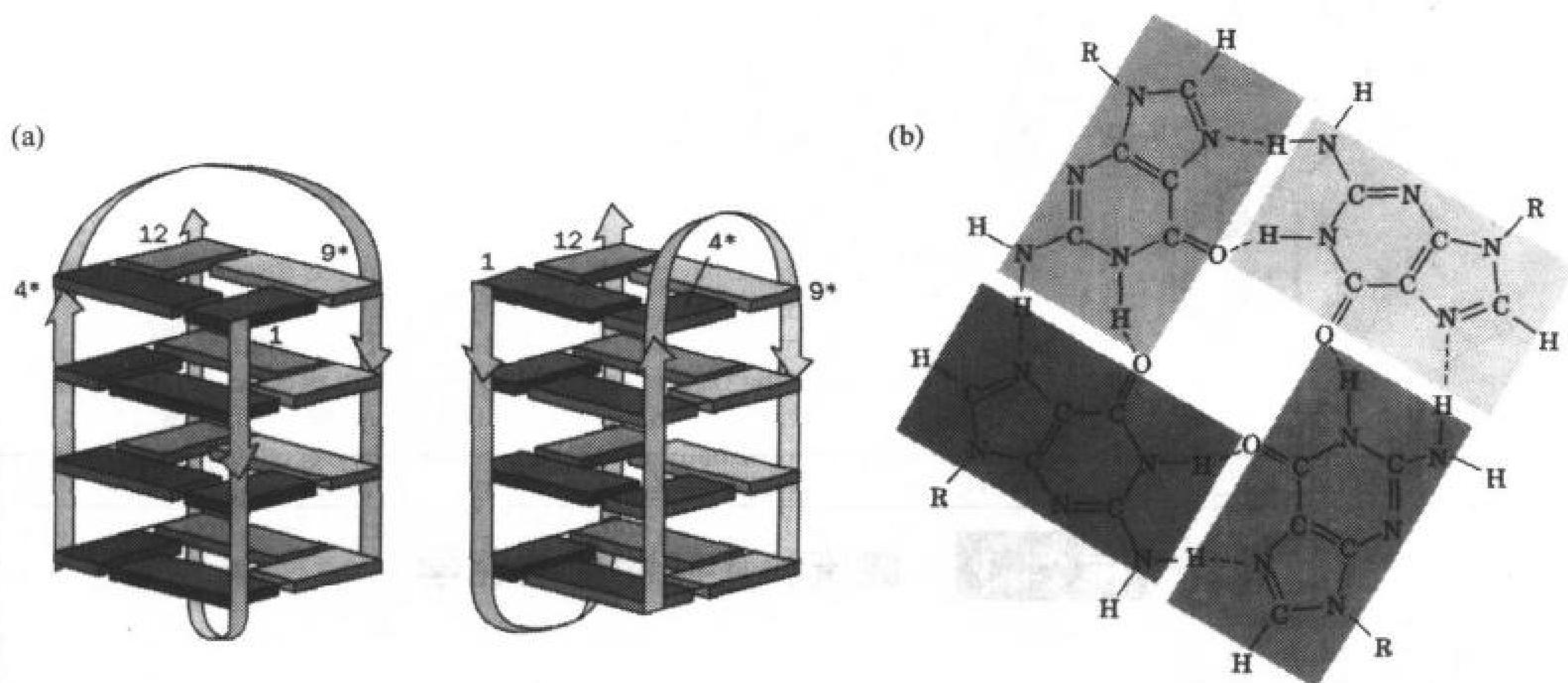


图 24-22 端粒寡核苷酸 d(GGGGTTTTGGGG)的结构

(a) NMR 溶液结构(左)和 X 射线晶体结构(右)的示意图,其中链方向由箭头表示。核苷酸在一条链中被编号为 1 到 12,在另一条链中为 1* 到 12*。鸟嘌呤残基 G1 到 G4 以蓝色矩形表示,G9 到 G12 为深蓝色。G1* 到 G4* 为红色,G9* 到 G12* 为粉红色。(b) G-四件套中的碱基配对相互作用。[引自 Schultze, P., Smith, F.W., and Feigon, J., Structure 2, 227(1994)]

4 突变

由 DNA 聚合酶及其伴随的校对功能所进行的 DNA 复制的忠实性,对于遗传信息在细胞分裂过程中的精确传递是至关重要的。然而聚合过程中的错误仍偶有发生,如果不被修正,就可能

改变基因的核苷酸序列。DNA 也可因环境因素而改变，如烷化剂和电离辐射。例如，紫外辐射(200～300nm)促使同一条 DNA 链上相邻胸腺嘧啶之间形成环丁基环，从而产生一个链内**胸腺嘧啶二聚体**(图 24-23)。类似的胞嘧啶和胞嘧啶二聚体也能形成，但频率较低。这种**嘧啶二聚体**在局部扭曲 DNA 的碱基配对结构，影响转录和复制。

在很多情况下，损伤的 DNA 可被修复，就像下节要讨论的那样(节 24-5)。然而，严重的损伤可能是不可逆的，会使遗传信息丢失，并且经常导致细胞的死亡。即使当损伤的 DNA 可以被修正，恢复也可能是不完美的，从而会产生**突变**，即一种可遗传的遗传信息的改变。在多细胞生物中，只有在遗传突变发生于性细胞系，从而此突变传到该生物的后代的所有细胞，通常才被观察到。与此相反，体细胞 DNA 损伤的影响很少超出该细胞范围之外，除非该突变引起恶性转化(癌症)。

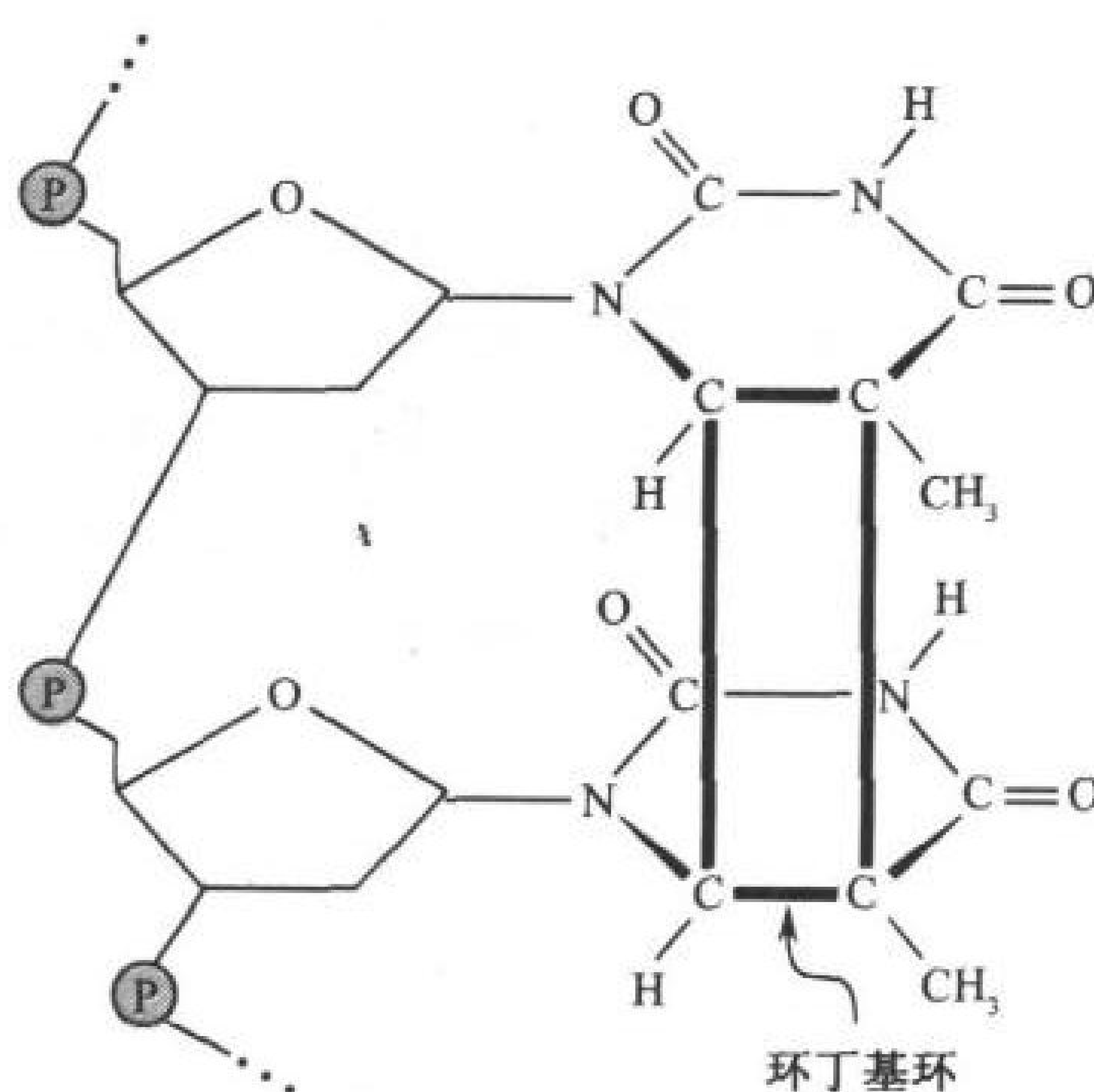


图 24-23　环丁基胸腺嘧啶二聚体
一条 DNA 链上两个相邻胸腺嘧啶残基在紫外线辐射下形成二聚体。连接胸腺嘧啶环(红)长约 1.6Å 的共价键比 B 型 DNA 中堆集碱基间的正常的 3.4Å 的距离要短得多，因此使 DNA 发生局部性扭曲。

A. 化学诱变

由**化学诱变剂**所产生的 DNA 损伤分为两大类：

1)**点突变**，其中一种碱基对代替另一种，又可被分为两个亚类：

(a) **转换**，其中一种嘌呤(或嘧啶)被另一种置换；

(b) **颠换**，其中一种嘌呤被一种嘧啶置换，或者是反过来(一种嘧啶被一种嘌呤置换)；

2)**插入/缺失突变**，其中一个或多个核苷酸对被插入或从 DNA 中被删除。

点突变由改变了的碱基产生

点突变可通过用碱基类似物或化学改变碱基的物质处理有机体而发生。例如，碱基类似物 **5-溴尿嘧啶(5BU)**的立体结构很像胸腺嘧啶(5-甲基尿嘧啶)，但是由于其溴原子的电负性影响，经常形成与鸟嘌呤而非与腺嘌呤碱基配对的互变异构体(图 24-24)。因此，当 5BU 代替胸腺嘧

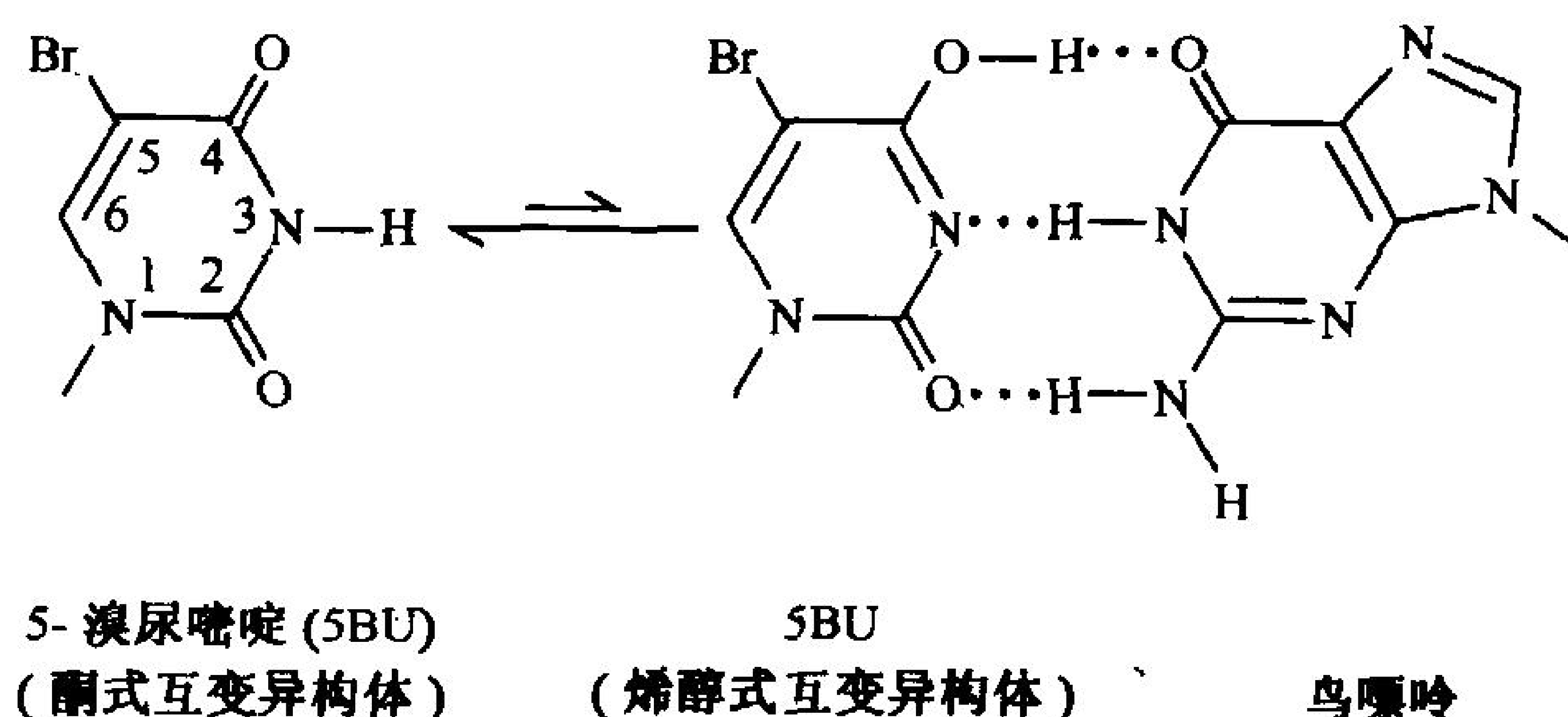


图 24-24　5-溴尿嘧啶
5BU(左)的酮式是其最常见的互变异构体。然而，5BU 经常采取与鸟嘌呤碱基配对的烯醇式(右)。

795

啶掺入DNA时，它可以在以后的DNA复制中诱导A·T→G·C的转换。5BU偶尔也代替胞嘧啶掺入DNA，此时它产生G·C→A·T的转换。

在水溶液中，亚硝酸(HNO_2)使芳香族伯胺氧化脱去氨基，因此它可将胞嘧啶转换为尿嘧啶(图24-25a)，并将腺嘌呤转换为鸟嘌呤样次黄嘌呤(它形成鸟嘌呤和胞嘧啶之间3个氢键中的两个；图24-25b)。因此，用亚硝酸处理DNA引起A·T→G·C和G·C→A·T两种转换。尽管有潜在的诱变活性，亚硝酸盐(亚硝酸的共轭碱)在制作像牛肉香肠这样的肉食时，仍被用作防腐剂，因为它也抑制 *Clostridium botulinum* 这种引起肉毒中毒病菌的生长。

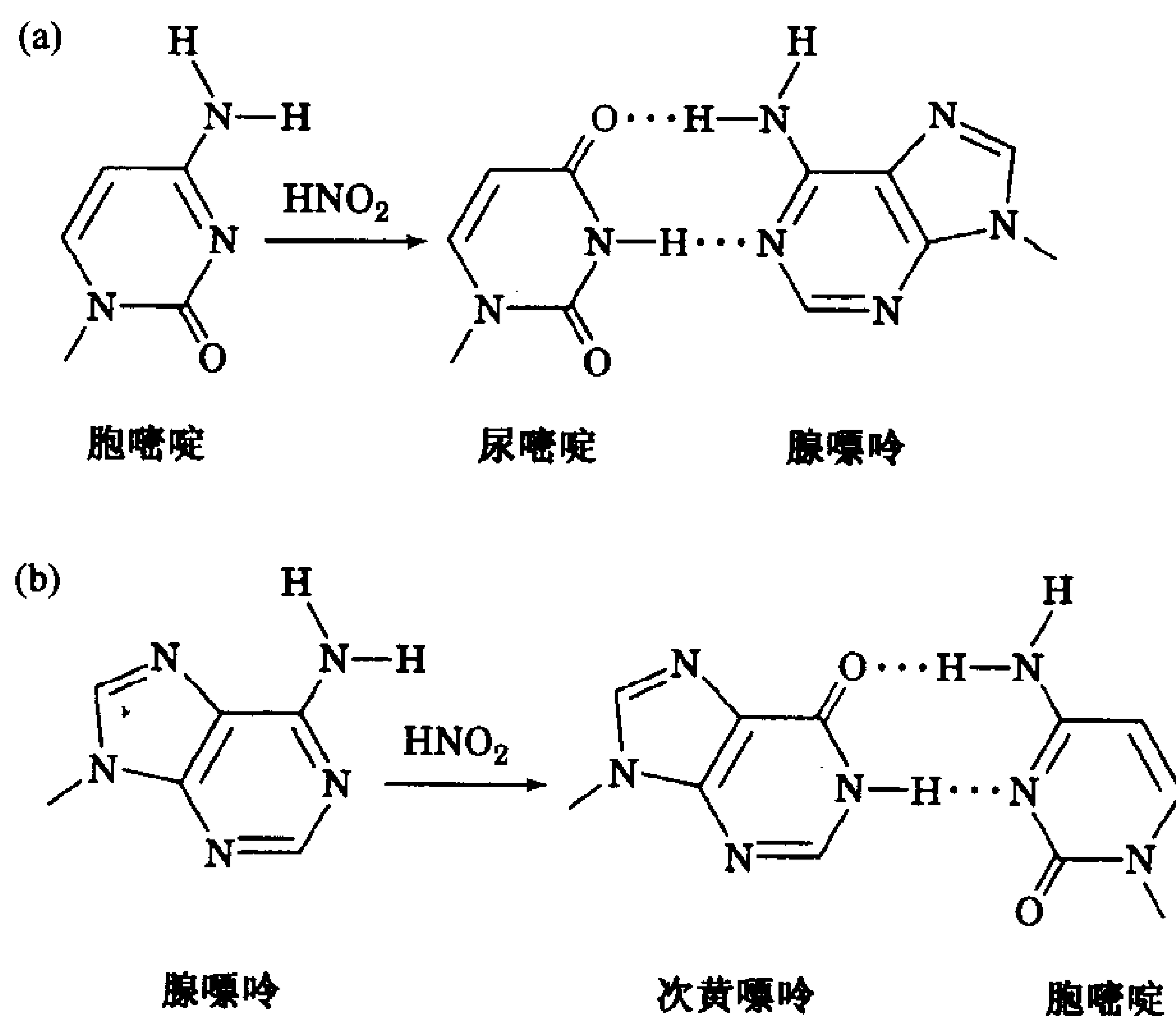
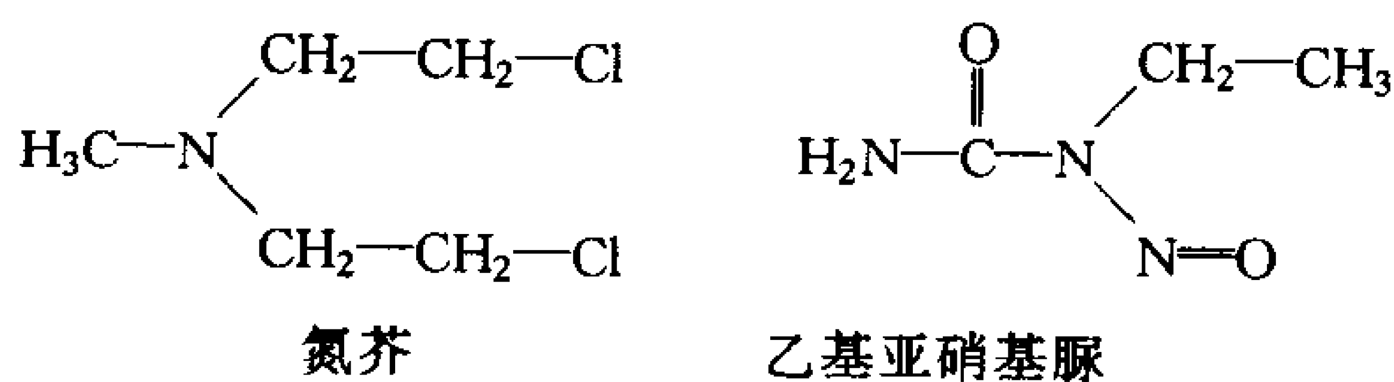


图24-25 由亚硝酸引起的氧化脱氨基作用

(a)胞嘧啶被转变为与腺嘌呤碱基配对的尿嘧啶。(b)腺嘌呤被转变为次黄嘌呤，一种与胞嘧啶碱基配对的鸟嘌呤衍生物(它缺少鸟嘌呤的2位氨基)。

烷化剂，例如硫酸二甲酯、**氮芥**和**乙基亚硝基脲**经常引起颠换。嘌呤核苷酸N7位的烷基化使其糖苷键恢复对水解敏感，从而导致碱基的丢失。所产生的序列中的缺口被一种易于出错的酶修复系统填平。当丢失的嘌呤被嘧啶代替，颠换就会发生。即使在没有烷化剂的情况下，人的每个细胞中每天估计有10 000个嘌呤核苷酸的糖苷键会自发水解。



核苷酸碱基对也能被甲基化修饰。例如，*S*-腺苷甲硫氨酸(节20-4D)，这种代谢物偶尔以非酶反应方式把一个碱基甲基化，从而形成其衍生物，例如3-甲基腺嘌呤和7-甲基鸟嘌呤残基。然而，甲基化反应经常具有正常的生理功能(见框24-4)。

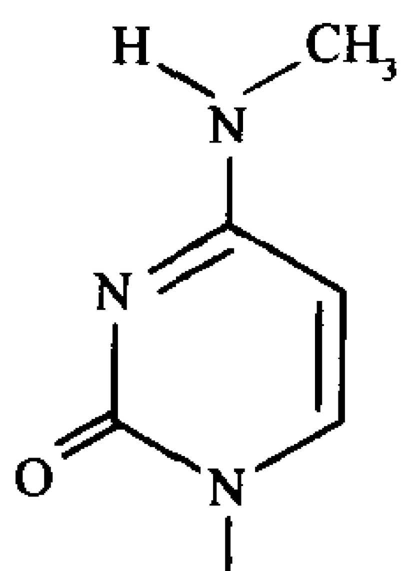
框24-4 生物化学焦点

DNA 甲基化

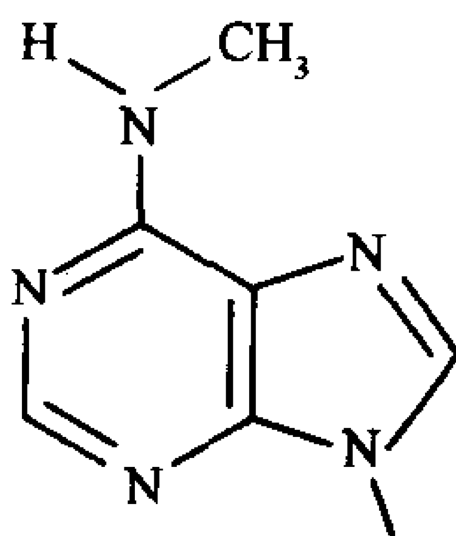
并非所有的DNA修饰都有害。例如DNA的A和C残基可以以种类特异性方式被分别甲基化，形成 **N^6-甲基腺嘌呤(m^6A)、N^4-甲基胞嘧啶(m^4C)和5-甲基胞嘧啶残基**。这些甲基(见下图)伸到B型DNA的大沟中，在此处它们可与DNA结合蛋白相互作用。在大多数细胞中，只有很小百分数的敏感碱基被甲基化，虽然这一数字在某些植物的C残基中高达30%以上。5-甲基胞嘧啶是脊椎动物中惟一被甲基化的碱基。

细菌DNA在它们自己特定的限制性位点处被甲基化，从而防止相应的限制性内切核酸酶将DNA降解(节3-4A)。甲基转移酶还以一种序列特异性方式修饰其他残基。

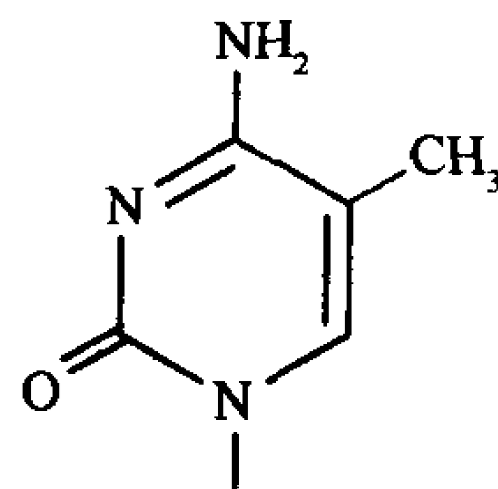
原核生物中甲基化最重要的作用就是在修复错配碱基对时作为亲代DNA的一个标记。任何一个逃脱了Pol I和Pol III校订作用的复制错配，仍可被一种称为错配修复的过程所修正。然而，如果这个系统只是纠正错误，而不是使它们永久化，它就必须区分具有正确碱基的亲代DNA和带有错误的却是正常碱基的子链。带有缺陷型甲基转移酶的大肠杆菌比野生型细菌突变率高，这一观察结果提示这种区分是如何作出的。与亲链相比，一个新复制出的子链是非甲基化的，因为DNA甲基化晚于DNA的合成。用模型DNA进行的实验证明，错配修复系统通过重新合成非甲基化链来修正一个错配。在错配处和亲链上甲基化位点对面的一点(可远至约1000bp以外)之间进行。



N^4-甲基胞嘧啶(m^4C)残基



N^6-甲基腺嘌呤(m^6A)残基



5-甲基胞嘧啶(m^5C)残基

在真核生物中，DNA甲基化模式随物种、组织以及沿染色体上的位置而不同。实验证据提示，DNA甲基化关闭真核生物基因的表达，尤其是当它发生在一个基因的转录序列上游的控制区时。例如，珠蛋白基因在红细胞中比它们在非红细胞中较少甲基化。事实上，亲代DNA链的甲基化模式指导其子链的甲基化，从而一个细胞系中甲基化模式的"继承"使所有细胞具有相同的分化表型。甲基化的变化也许负责哺乳动物的基因组印记，这种现象是某些母本和父本基因在其后代中被分化表达。

插入/缺失突变由嵌入试剂产生

796

插入/缺失突变可通过用嵌入试剂如吖啶橙或核黄素处理DNA而产生(节23-3B)。两个连续碱基对之间的距离，由于在它们之间嵌入了这样一个分子，而大致变为原来的两倍。这种被扭曲的DNA的复制，偶而导致在新合成的多核苷酸中有一个或多个核苷酸的插入或缺失(大片段的插入和缺失通常缘于异常的交换过程；节24-6A)。

突变的随机性

大部分关于诱变的科学数据都表明，所有突变无论是聚合酶出错的结果，还是自发修饰或DNA化学损伤，都是随机发生的。这一法则受到了John Cairns的挑战，他证明不能分解乳糖的细菌，当只有乳糖作为养料时，为了利用乳糖而选择性地获得它们所需要的突变。这一观察结

797

果,与其表明细菌能够“指导”有利于它们的突变,倒不如说反映出一种非特异性的适应反应,在这种反应中,当细胞处于代谢逆境下,其总体突变率——不管是有用的还是没用的——都提高了。高突变状态似乎反映了在正常生长的细胞中,相对不活跃的易于出错的 DNA 修复及重组系统的激活。

B. 致癌剂

并非所有的 DNA 改变都具有表型效果,例如 DNA 非编码片段的突变经常是看不出来的。类似地,遗传密码的冗余性(不止一个三核苷酸可以决定一种特定的氨基酸;节 26-1C)可以掩盖点突变。即使当一个蛋白质的氨基酸序列被改变,如果此改变是保守的(节 5-4A)或发生在表面环,那么其功能可能被保留。然而,即使是单个点突变,如果在恰当的位置上,也可以不可逆地改变细胞代谢,例如导致癌变。高达 80% 的人类癌症可由 DNA 损伤或干扰其复制或修复的**致癌剂**引起,因此许多诱变剂也是致癌剂。

目前已有超过 60 000 种具商业重要性的人造化学物质,并且每年要新增约 1000 种。标准的致癌动物试验是将大鼠或小鼠经受高浓度的准致癌剂,并检测癌症,这种方法代价昂贵,且需要约 3 年时间才能完成。因此,只有相对很少的物质是通过这种方法来测试。同样,在人类中进行流行病学研究,代价高,费时间,而且经常不能有结论。

Bruce Ames 基于致癌和致突变之间的高度相关性,设计了一种快速、有效的致癌性的细菌测试方法。他构建了一种基因型为 his^-(不能合成组氨酸,并因此在缺少组氨酸的情况下不能生长)的沙门氏伤寒杆菌(*Salmonella typhimurium*)测试菌株。这些菌株的突变可通过它们回复到 his^+ 表现型而被测试出来。

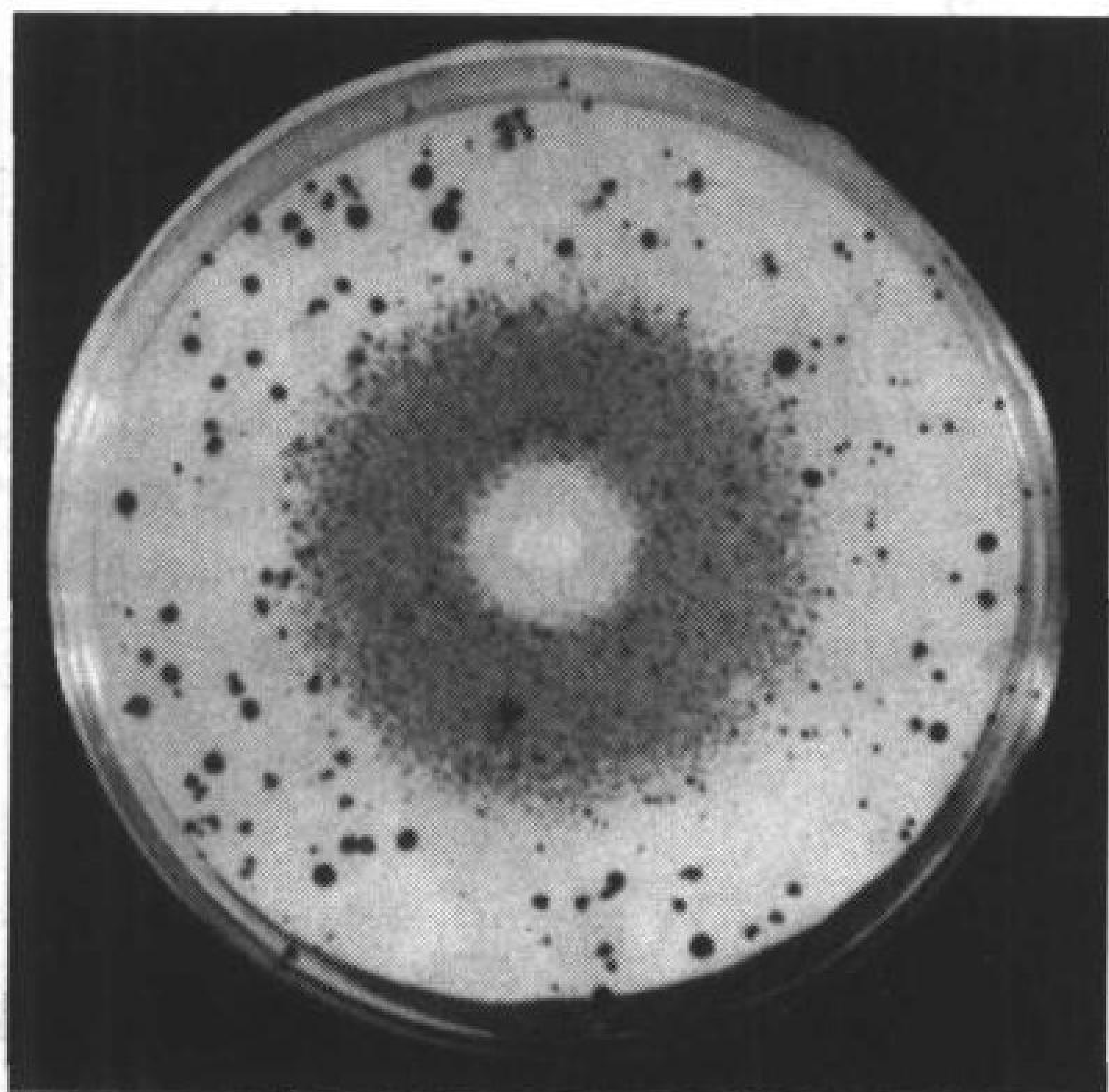


图 24-26 Ames 诱变试验

含有诱变剂、烷化剂乙基甲磺酸的滤纸盘被放在一块沙门氏伤寒杆菌 his^- 试验菌株培养平板的中心,培养基中不含有组氨酸。一圈密集的回复突变体菌落出现在诱变剂所扩散的圆盘周围。分布于培养平板四周的大菌落是自发回复突变体。圆盘附近的细菌已被高浓度的有毒诱变剂杀死。(经法国居里研究所 Raymond Devoret 允许转载此图)

在 **Ames 试验**中,约 10^9 测试菌株被涂布分散于一块不含组氨酸的培养平板上。加在培养基中的诱变剂导致某些 his^- 细菌突变为 his^+,这可以在 37℃ 下培养 2 天后长成可见菌落而被检测出来(图 24-26)。某一物质的致突变性被评价为突变菌落数减去在不加该诱变剂时所产生的自发回复菌落的数目。

很多非致癌剂在肝脏或在其他组织中通过各种解毒反应而被转变为致癌剂。因此少量的大鼠肝匀浆被包括在 Ames 试验的培养基中,用以模拟哺乳动物代谢的影响。

在整体动物实验中,被检测为致癌剂的化合物,约有 80% 用 Ames 试验检测也是诱变的。在多种浓度下测试某给定化合物,得到的剂量反应曲线几乎总是线性的,这表明诱变没有阈值浓度。用 Ames 试验发现是致突变的好几种被人类广泛接触的化合物,后来在动物试验中也均被发现是致癌的。这些化合物包括 70 年代中期被用为儿童睡衣阻燃剂,并且

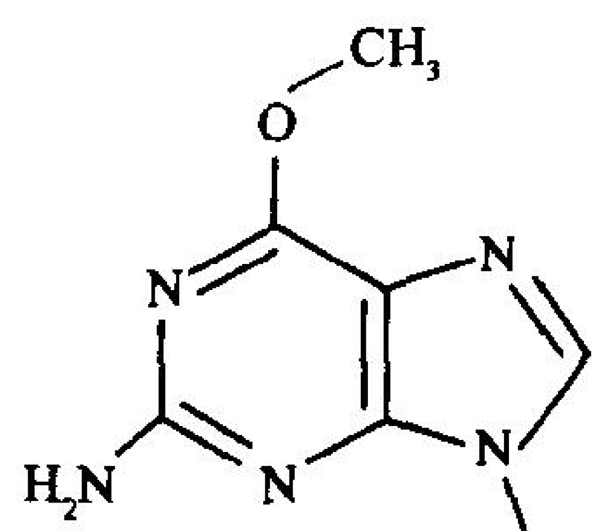
可以通过皮肤被吸收的 **tris(2,3－二溴丙基)磷酸**以及**呋喃糖酰胺**,60 年代和 70 年代在日本被用作许多制成食品中的抗菌添加剂(在它被发现是致突变的之前,还通过了两种动物试验)。 798

5. DNA 的修复

DNA 的损伤必须被修复,以保持遗传信息的完整性。DNA 修复的生物学重要性由机体存在的大量不同的复制机制而得到反映。甚至像大肠杆菌这样简单的生物也存在各种修复机制。这些修复系统包括多种酶,它们可以简单地回复核苷酸碱基的化学修饰,以及更复杂的多酶系统,它们依赖于双螺旋 DNA 中用以恢复损伤分子的内在的冗余信息。

A. 损伤的直接回复

有几种酶可识别 DNA 中被修饰的核苷酸碱基,并将它们恢复到原来的状态。例如,**O^6-甲基鸟嘌呤**,这种烷基化的碱基,在 DNA 复制过程中经常引起胸腺嘧啶代替鸟嘌呤掺入。这个烷基化的碱基可被 **O^6-甲基鸟嘌呤-DNA 甲基转移酶**所识别,它直接将这个入侵的甲基转移到它自身的一个半胱氨酸上。这个反应使该蛋白质失活,因此它不能严格地归类为酶。



O^6-甲基鸟嘌呤残基

某些被 UV 损伤的 DNA 形式,也能被一步修复。嘧啶二聚体可通过**光复活作用**回复到它们的单体形式,这一反应是由 **DNA 光裂合酶**所催化,它是一种光吸收酶。这些 55～65kDa 的单体酶存在于许多原核生物和真核生物中,但人体中没有。光裂合酶含有两个辅基:一个吸收光能的辅助因子和 $FADH^-$。大肠杆菌光裂合酶的辅因子是 N^5,N^{10}-次甲四氢叶酸(节 20-4D),可吸收紫外-可见光(300～500nm),并将此激发能量传给 $FADH^-$,它随后将一个电子传递给嘧啶二聚体,从而把它分开。产生的嘧啶阴离子还原 $FADH^-$,从而使酶再生。

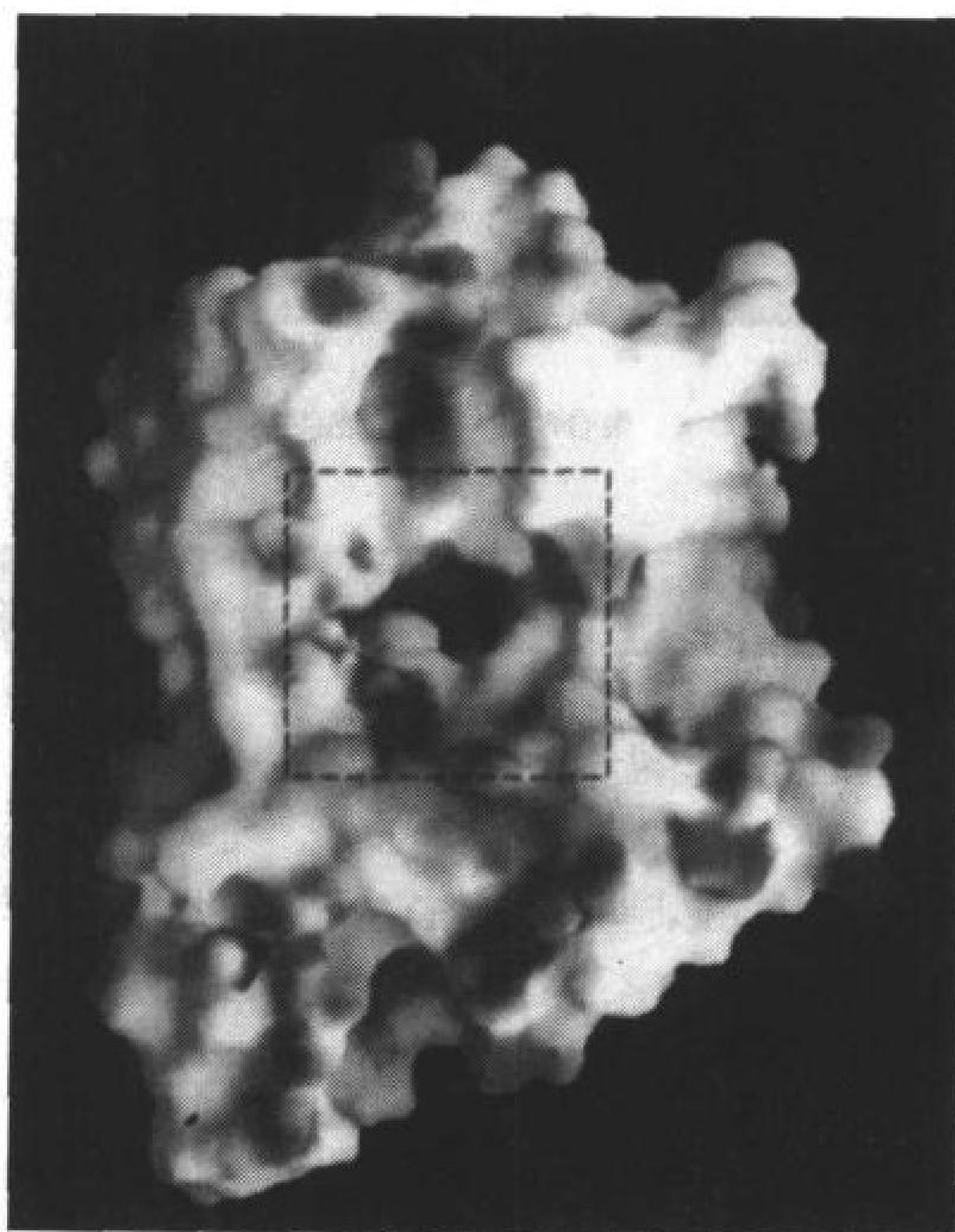


图 24-27　大肠杆菌 DNA 光裂合酶的 X 射线结构
该酶的溶剂可及表面根据静电势着色(蓝,正电;红,负电;白,中性)。虚线围住了被认为结合嘧啶二聚体的蛋白质表面的孔洞。(经德克萨斯大学西南医学中心 Johann. Deisenhofer 允许转载此图)

大肠杆菌 DNA 光裂合酶结合单链或双链 DNA 与碱基的序列无关。其 X 射线结构表明它的 DNA 结合位点是一个带正电的具有孔洞的平坦表面,孔洞的大小和极性都与嘧啶二聚体互补(图 24-27)。为了在此位点结合,并和用于与电子转移的 $FADH^-$ 的异咯嗪环相接触,嘧啶二聚体必须翻转到双螺旋之外。这种构象改变,也许是碱基修饰酶反应的共同特点,它可能由于相对较弱的嘧啶二聚体的碱基配对以及其造成双螺旋的扭曲较小而易于发生。

799

B. 核苷酸切除修复

嘧啶二聚体也可以由核苷酸切除修复(NER)而被纠正，在NER中，一段含有损伤的寡核苷酸从DNA中被切除，所产生的单链缺口被填平。在大肠杆菌中，嘧啶二聚体被多亚基酶识别，该酶是 *uvrA*、*uvrB* 和 *uvrC* 基因的产物，这个 **UvrABC 内切核酸酶**在一个依赖ATP的反应中，分别在二聚体5′侧第7个和3′侧第4个磷酸二酯键处切割含二聚体的DNA链(图24-28)。被切除的寡核苷酸通过DNA聚合酶，可能是Pol I，以及跟着而来的DNA连接酶的作用而被置换。UvrABC内切核酸酶也切除其他类型的DNA损伤，损伤中碱基常被从其正常位置移开，或含有庞大取代基。显然，UvrABC内切核酸酶识别螺旋的扭曲而不是个别特定的基团。

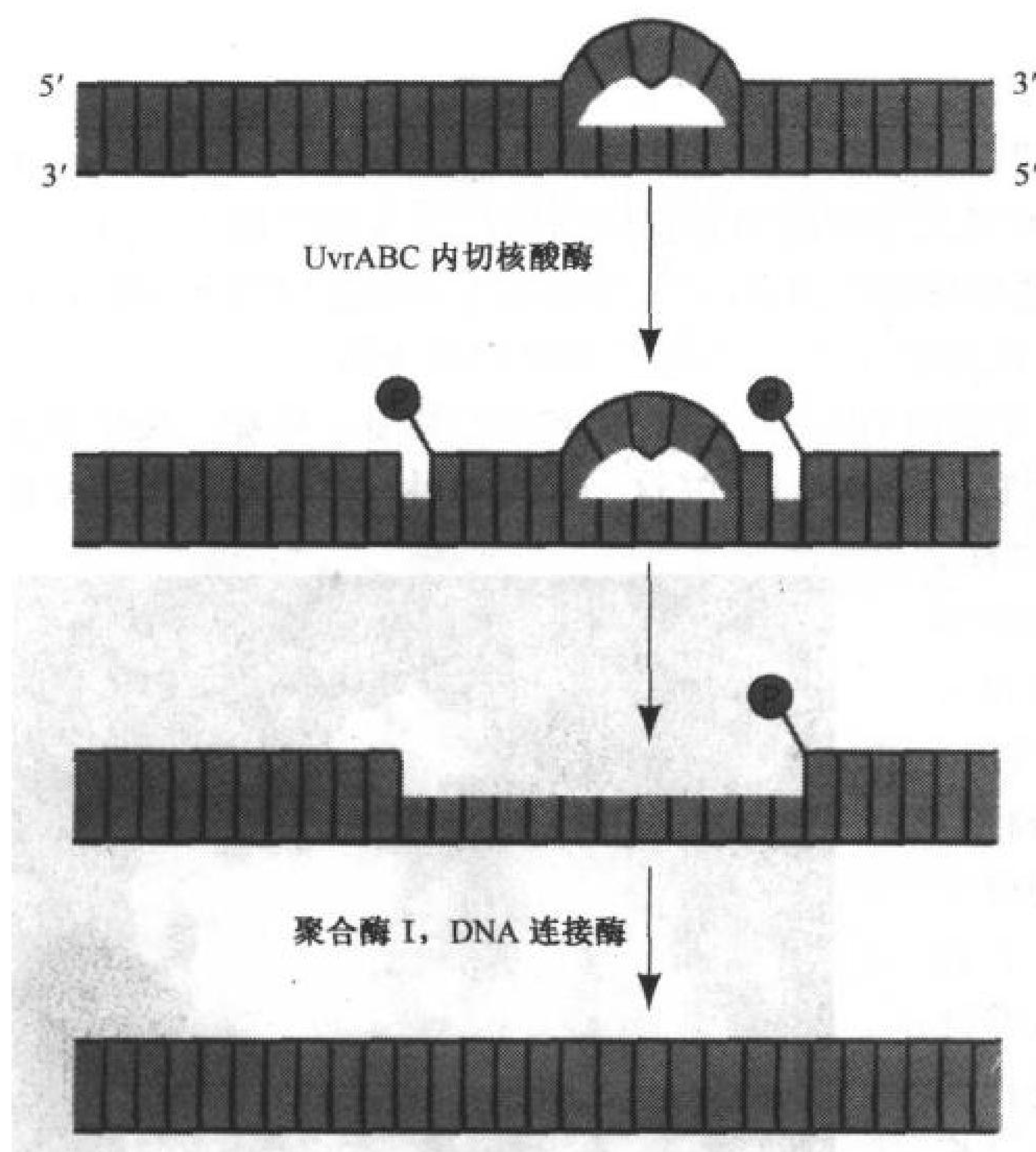


图 24-28 嘧啶二聚体的核苷酸切除修复(NER)机制

真核生物的NER需要多达16种多肽，并且从一条损伤的DNA链上切除24～32个核苷酸。缺陷的NER和人类的两种疾病有关。**色素沉着性干皮病**(xeroderma pigmentosum)(XP；希腊语：xros, dry + derma, skin)，这种人类罕见的遗传病的主要特征是皮肤细胞不能修复由紫外线诱导的DNA损伤。患有这种常染色体隐性疾病的人对阳光极度敏感，他们在婴儿期就发生显著的皮肤改变，例如皮肤干燥、过度产生斑点以及角化病(一种皮肤肿瘤)，伴有眼睛的损伤，例如角膜的浑浊和溃疡。此外，他们患致命皮肤癌的几率比正常人高2000倍。奇怪的是，许多XP患者同时还有多种令人不解的看似无关的症状，包括进行性神经退化和发育不良。7个明显参与修复UV损伤DNA的基因产物中任何一个的缺陷都会导致XP。**Cockayne 综合征**(CS)，这种遗传病也和NER的缺陷有关，它是由某些与在XP中相同的基因缺陷以及另外两个基因的缺陷导致的。CS患者对紫外线辐射高度敏感，并且表现出生长迟缓，由于神经元脱髓鞘作用造成的神经功能障碍，但令人不解的是他们发生皮肤癌的几率与常人相同。

糖基化酶去除改变了的碱基

含有一个损伤了的碱基的DNA，可以通过由多种DNA糖基化酶介导的一种切除修复而被恢复到其天然状态。这些酶中的每一个分别切割一种特定类型的改变了的核苷酸的糖苷键(图24-29)，从而在骨架上留下一个脱氧核糖残基。这种**无嘌呤**或**无嘧啶**(AP)位点，在正常生理条件下也可通过糖苷键的自发水解(节24-4A)而产生。脱氧核糖残基随即在一侧被一个 **AP 内切**

核酸酶所切割，脱氧核糖及其附近几个残基被 DNA 聚合酶的外切核酸酶或其他几种细胞内的外切核酸酶去除，所产生的缺口被 DNA 聚合酶和 DNA 连接酶填平并封口。

尿嘧啶在正常情况下不存在于 DNA 中，它可被**尿嘧啶 N-糖基化酶**切除，并通过切除修复由 C 取代。这个过程对遗传信息的完整性是必需的。

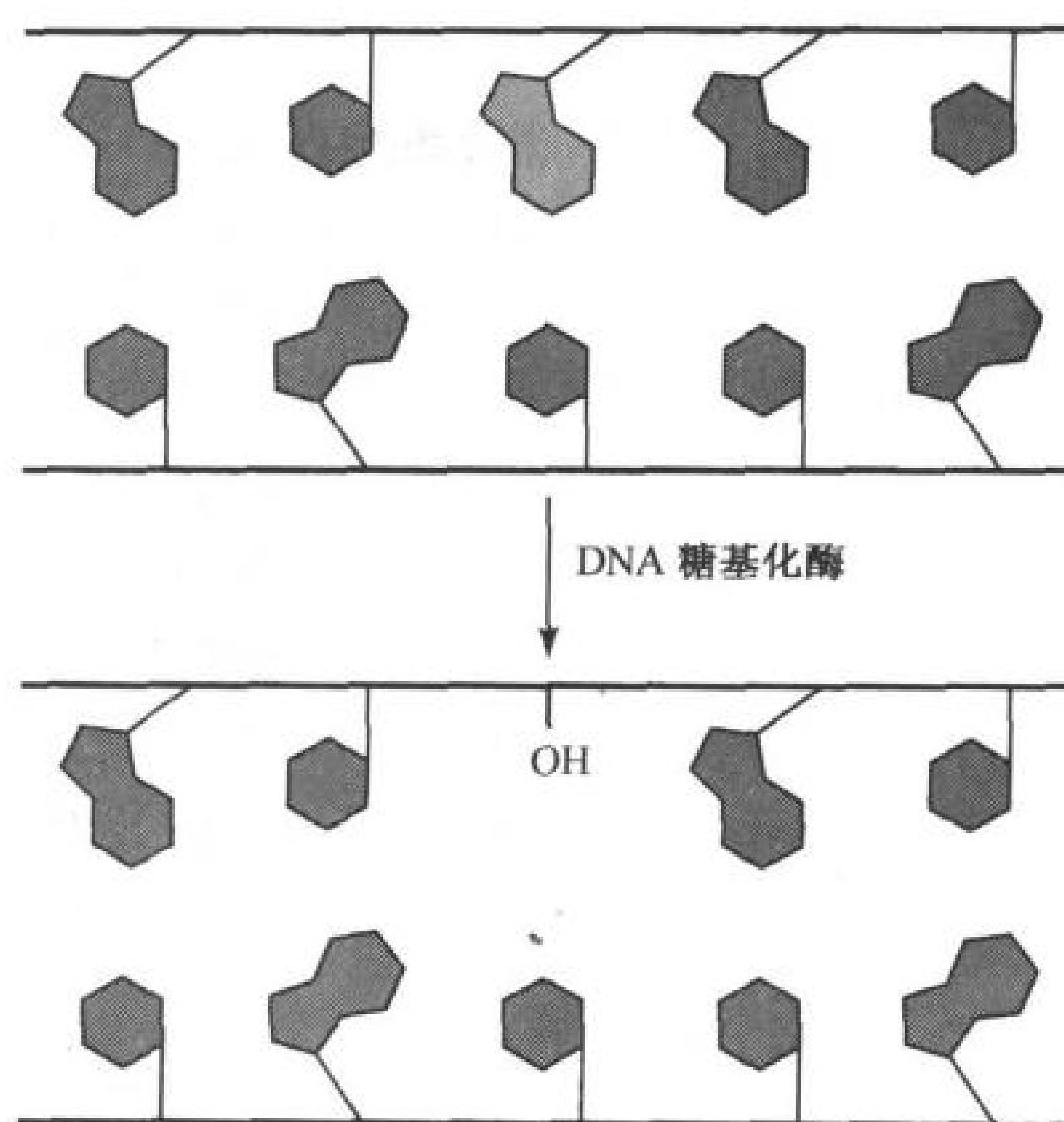


图 24-29　DNA 糖基化酶的作用
这些酶水解相应的已变化碱基（红）的糖苷键，从而生成一个无碱基位点。

框 24-5　生物化学相关内容

为什么 DNA 不含尿嘧啶？

DNA 中的 3 种脱氧核苷酸碱基（腺嘌呤、鸟嘌呤和胞嘧啶）在 RNA 中也都以核糖核苷酸碱基存在。第四种脱氧核苷酸碱基，即胸腺嘧啶，是由存在于 RNA 中的尿嘧啶，通过相当复杂的代谢途径（节 22-3B）而合成的。由于尿嘧啶和胸腺嘧啶具有相同的碱基配对性质，为何细胞还要合成胸腺嘧啶呢？

这个谜由胞嘧啶易于自发地或与亚硝酸盐反应，脱氨基转变为尿嘧啶的发现而被解开（节 24-4A）。如果 U 是 DNA 的一个正常碱基，C 的脱氨作用将是高度诱变的，因为无法辨明所产生的错配的 G·U 碱基对原来是 G·C 还是 A·U。然而，由于 T 是 DNA 的正常碱基，因此 DNA 中任何一个 U 几乎肯定是一个脱去氨基的 C，并能被尿嘧啶 N-糖基化酶去除。

尿嘧啶 N-糖基化酶在 DNA 复制中还有一个重要功能。dUTP 是 dTTP 合成中的中间体，在所有细胞中都只存在少量的 dUTP。DNA 聚合酶不能很好地区别都可与模板 A 进行碱基配对的 dUTP 和 dTTP。因此，新合成的 DNA 偶尔含有 U，这些 U 通过切除修复迅速地被 T 取代。

C. SOS 反应和重组修复

800

造成 DNA 损伤的试剂可在大肠杆菌中诱导一种细胞改变的复杂系统，被称为 **SOS 反应**。进行 SOS 反应的细胞停止分裂，并增强了修复损伤 DNA 的能力。一种阻遏物 **LexA** 和一种 DNA 结合蛋白 **RecA** 调节这一系统的活性。在正常生长过程中，LexA 阻遏 SOS 基因表达。但是，当 DNA 遭到损伤（而且不能全部复制）时，所产生的单链与 RecA 结合，所形成的 DNA·RecA 复合物激活 LexA 切割自身，从而自我灭活。SOS 基因，包括 *recA* 和 *lexA* 以及切除修复基因 *uvrA* 和 *uvrB*（节 24-5B）因此被表达。当 DNA 被修复后，DNA·RecA 复合物不复存在，所以新合成的 LexA 再次阻遏 SOS 基因的表达。

SOS 修复易于出错，因此是诱变性的。这是因为 SOS 修复系统即使在不知道原来是哪些碱基存在的信息下，也会在 DNA 损伤处置换碱基。因此 SOS 修复系统验证了达尔文观念中的命题，即冒着丧失功能的风险（也许可以获得新的功能）而活着比死更有利。

重组修复和遗传重组相似

801 RecA 蛋白也介导**遗传重组**(genetic recombination),即同源 DNA 片段之间多核苷酸链的交换(重组将在下节详细描述)。带有突变的 *recA* 基因的大肠杆菌细胞不能进行遗传重组和**重组修复**(recombination repair),后者也被称为**复制后修复**(postreplication repair),这个系统可以在损伤的 DNA 被修复之前进行复制时起作用。例如,当复制机器碰到一个嘧啶二聚体时会停下来,并在二聚体位点后的某处重新开始聚合,产生的子链在嘧啶二聚体的对面有一个缺口(图 24-30)。这种遗传损伤不可能被切除修复所去除,因为它要求有一条完好的互补链。然而这样一条完好链存在于同一个复制叉形成的姐妹双螺旋中。因此损伤可以通过交换姐妹 DNA 链的相应片段而被修正。这将有缺口的 DNA 片段置于一条未损伤链的对面,因此该缺口可根据模板被填平,并随后被封口。嘧啶二聚体此时也和一条完好的互补链相结合,随后可被 NER 去除,或被光裂合酶光复活。

802

803

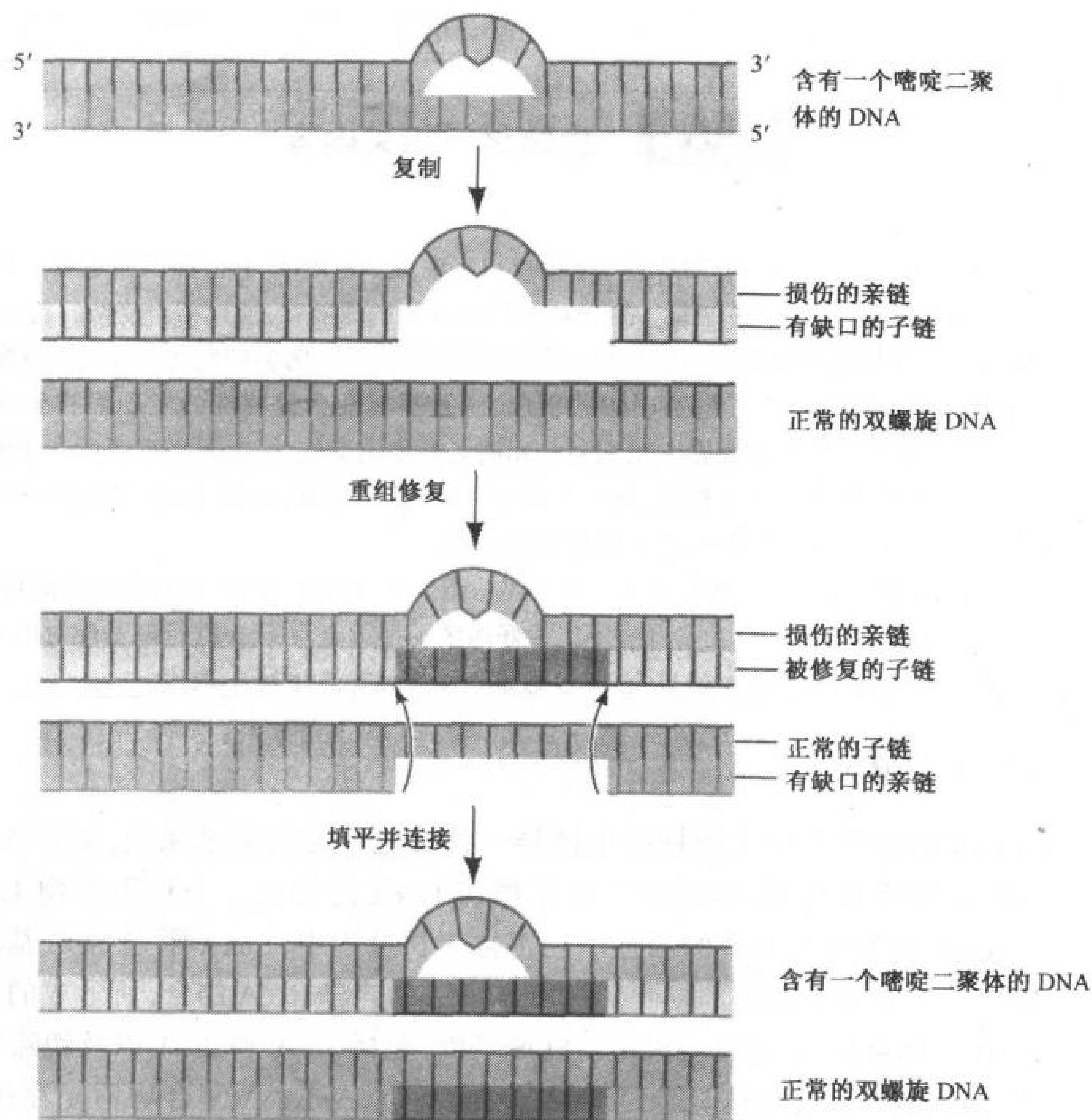


图 24-30 重组修复

这一系统允许损伤位点相对的新合成的 DNA 链上的缺口被来自其姐妹双螺旋的相应片段填平。

6. 重组

多年以来,遗传研究表明基因并非永恒不变。在高等生物中,当同源染色体并排排列时,基因对可以进行交换(图 24-31)。不含双倍染色体的细菌也具备一种精妙的机制用于重组遗传信息。此外,外源 DNA 通过重组可被安装到一个宿主的染色体上。在这一节,我们考察重组的分子事件,并讨论**转座子**(transposon)这种流动的遗传因子的生物化学。

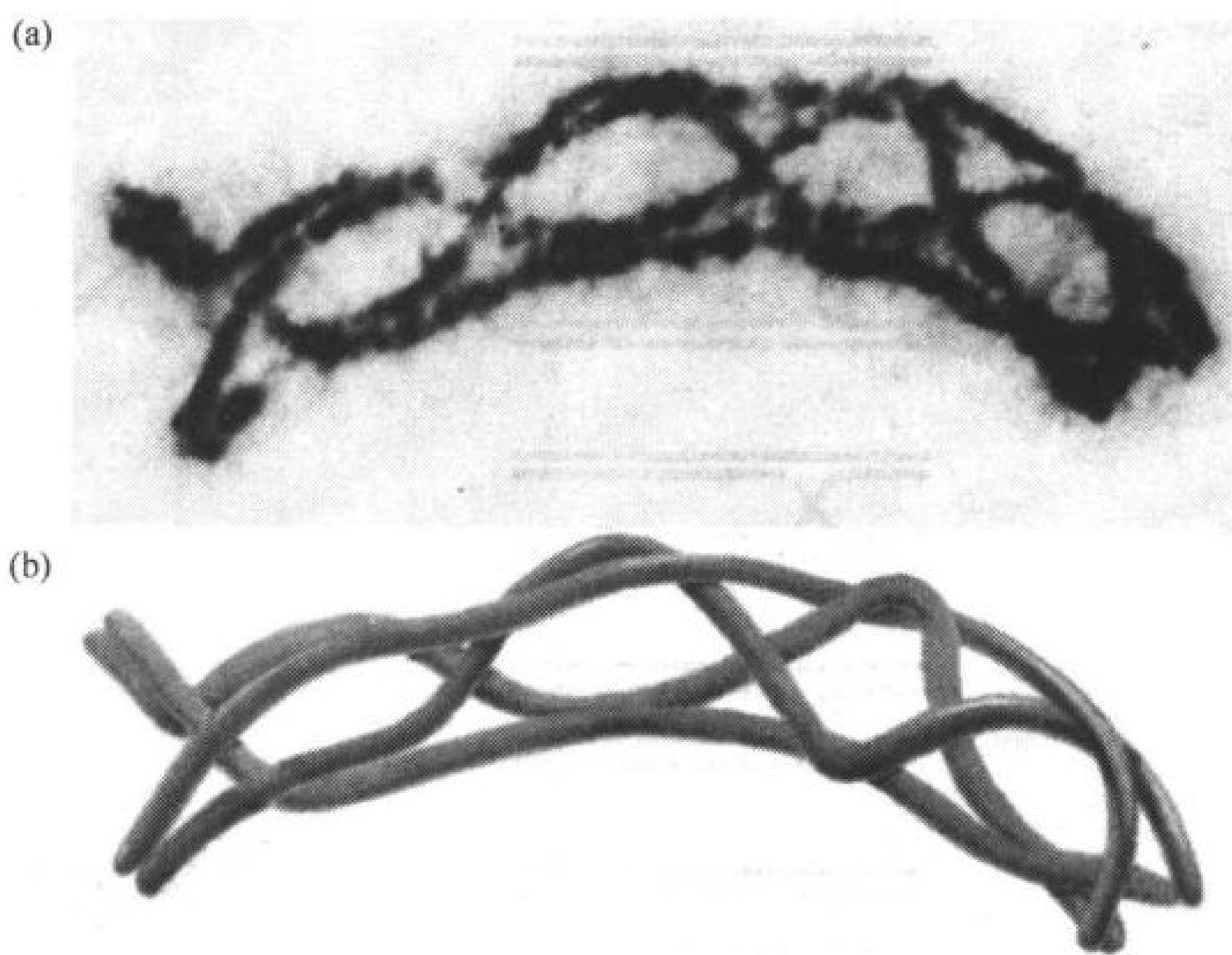


图 24-31 交换

蝗虫 *Chorthippus parallelus* 减数分裂过程中两个同源染色单体对的电子显微照片(a)及其示意图(b)。当两种非姐妹染色单体(不同颜色)交换时,可在任何一点上重组。(经澳大利亚国立大学 Bernard John 允许转载此图)

A. 一般性重组的机制

一般性重组发生在具有广泛同源性的 DNA 片段之间;**位点特异性重组**(site-specific recombination)发生在两条短的特异性 DNA 序列之间。一般性重组的典型模型(图 24-32)由 Robin Holliday 在 1964 年提出。两条并排的同源 DNA 双螺旋上的对应链被切开一个切口,有切口的链交换,并与同源双螺旋中邻近的互补链配对,从而形成一个**异源 DNA** 片段,然后切口被密合(图 24-32a~e)。交换点是一个被称为 **Holliday 连接**的四链结构(图 24-33),交换点在所谓的**分支移位**过程中可以向两个方向移动(图 24-32e, f)。

Holliday 连接可通过两种同等可能的途径被“拆分”为两个双螺旋 DNA(图 24-32g~l):

1) 没有发生交换的链的切割,使原来双螺旋的末端发生交换,从而在切口密合之后形成传统的重组 DNA 分子(图 24-32g~l 右侧);
2) 发生交换的链的切割,使一对同源单链片段发生互换(图 24-32j~l 左侧)。

RecA 促进大肠杆菌的重组

352 个残基的 RecA 蛋白在单链 DNA 或含有一个单链缺口的双螺旋 DNA 上聚合。电子显微镜发现和 DNA 结合的 RecA 细丝形成每圈约 6.2 个 RecA 单体的右手螺旋(图 24-34)。每个 RecA 单体结合 3 个核苷酸,使 DNA 具有每圈约 18.6 个核苷酸的伸展构象(B 型 DNA 每圈有 10.4 个碱基对)。RecA 的 X 射线结构证实,RecA 细丝的中央孔具有 25Å 的直径,足够容纳 DNA。

804

RecA 是如何介导单链和双螺旋 DNA 之间的 DNA 链交换的呢?当遇到一条带有与 RecA 所结合的单链 DNA 互补的双链 DNA 时,RecA 部分地解开双链,并使单链 DNA 与双链上的对

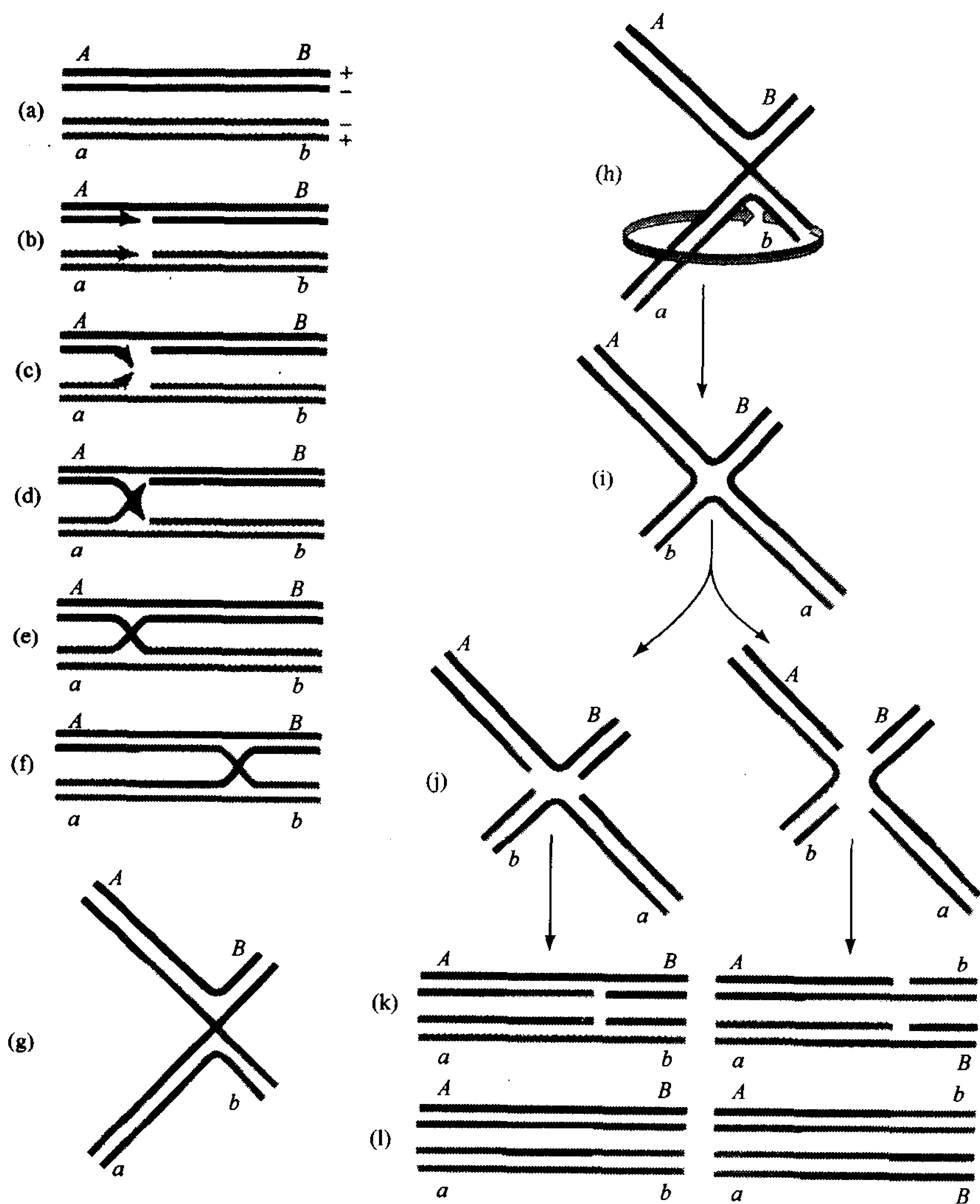


图 24-32　功能的秘诀:同源 DNA 双螺旋之间一般性重组的 Holliday 模型

应单链发生交换,这反应是由 ATP 水解驱动的。ATP 水解被认为是驱动结合在蛋白质上的一个三链 DNA 中间体的重排(图 24-35a)。

RecA 催化的两个双链 DNA 片段的交换过程与此类似(图 24-35b)。同源 DNA 片段在链交换之前先配对,推测三链或四链 DNA 区域在 RecA 螺旋的孔洞中形成(图 24-36)。真核生物含有与大肠杆菌 RecA 同源的蛋白质,并显然以一种类似依赖 ATP 的方式介导 DNA 的重组。

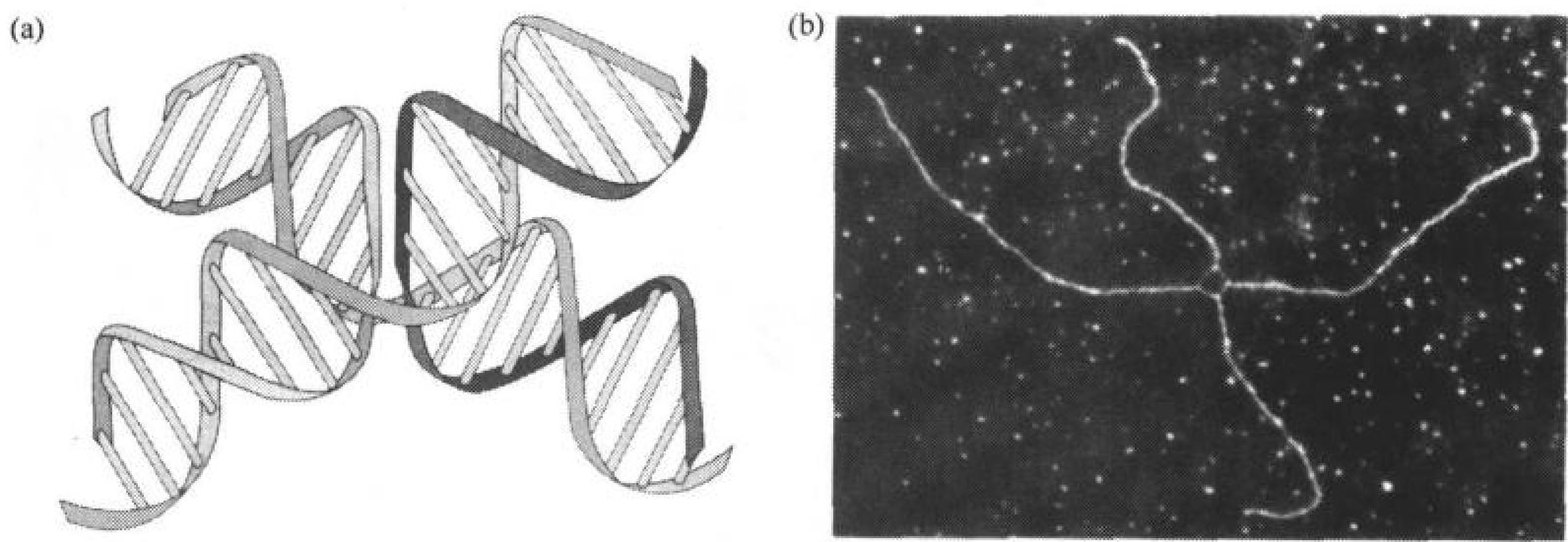


图 24-33　Holliday 连接

(a)一种不违反立体化学原则，能量上最有利的构象的推测模型。(After Murchie,, A. I. H, Clegg, R. M., von Kitzing, E., Duckett, D. R., Diekman, S., and Lilley, D. M. J., Nature 341, 765(1989))(b)正在重组的 DNA 的电子显微照片。请注意在交换区域处较细的单链连接。(经哈佛大学医学院 Huntington Potter 和牛津大学 DavidDressler 允许转载此图)

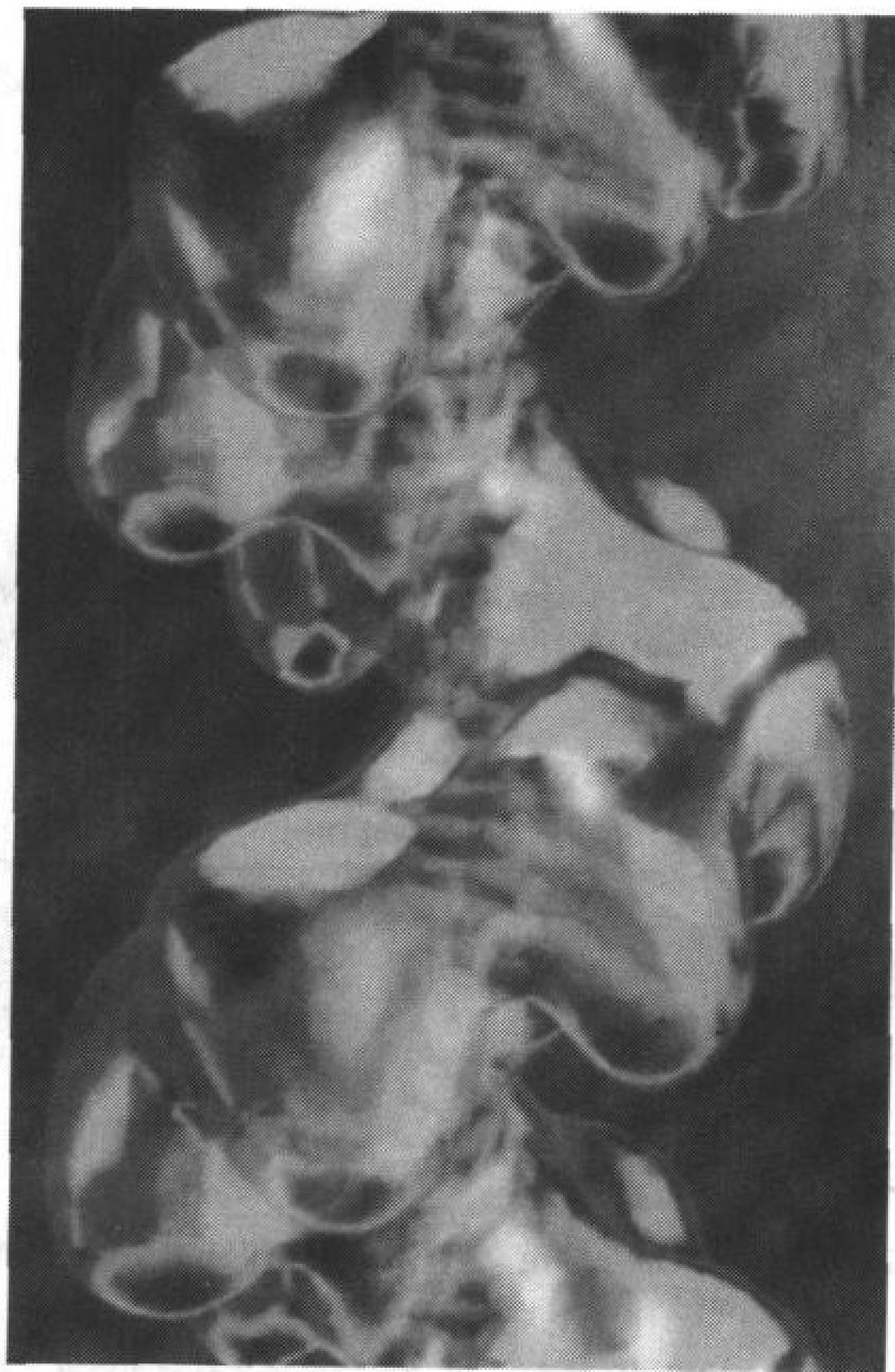


图 24-34　RecA-DNA 复合物的模型

在这张基于电子显微镜的图像中，透明的表面代表一条大肠杆菌 RecA 细丝。伸展并解螺旋的双螺旋 DNA(红)被做成模型置于图中。(经明尼苏达大学医学院 Edward Egelman 允许转载此图)

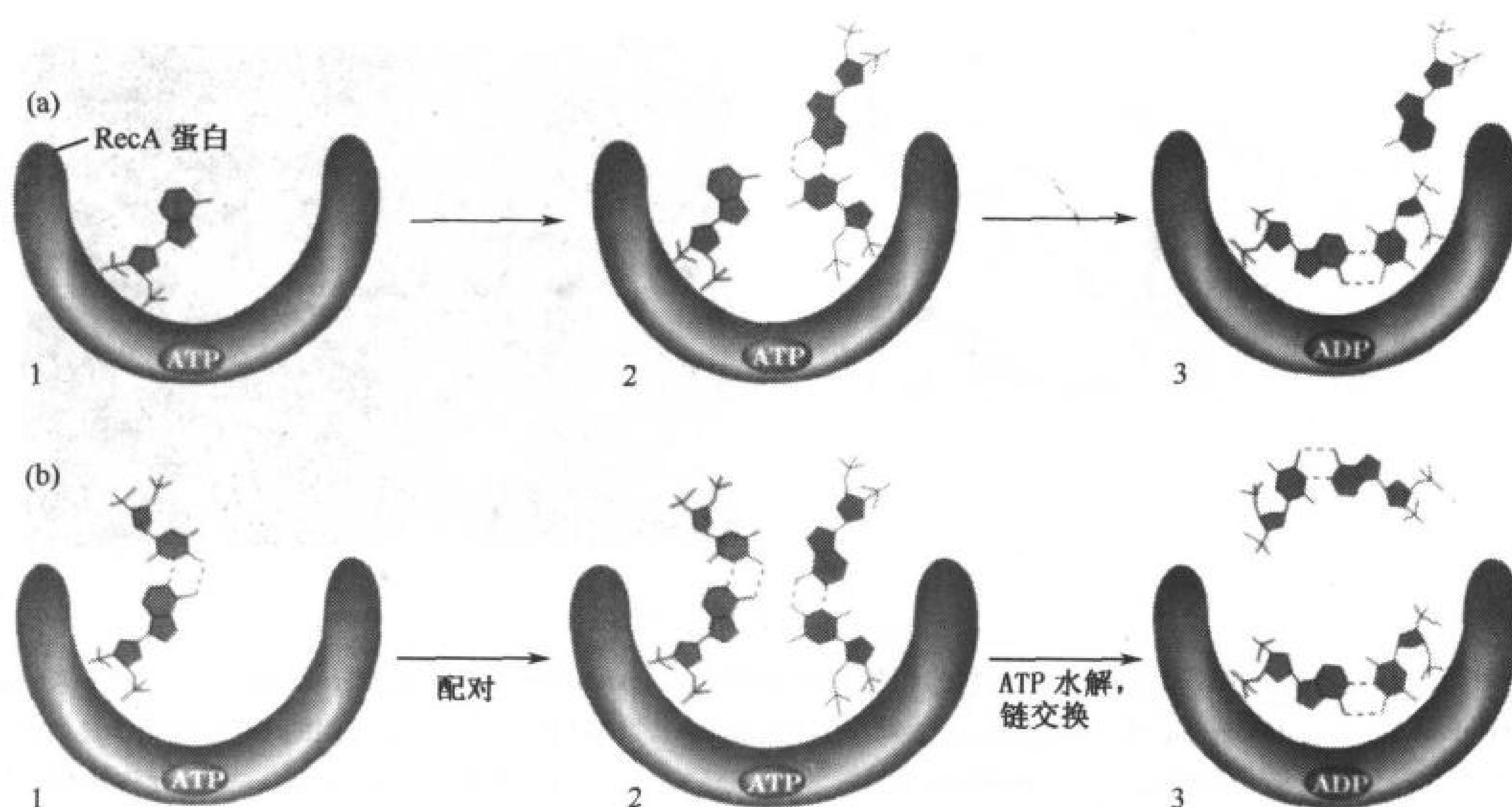


图 24-35 RecA 介导的配对和链交换的推测模型

(a)涉及一条单链和一个双链 DNA 的交换。(b)涉及两个双链 DNA 的交换。(1)一条单链 DNA(在 b 中为双链)与 RecA 结合形成起始复合物。(2)双链 DNA 与起始复合物结合,从而短暂形成三链螺旋(在 b 中是四链)。(3) RecA 旋转并列的同源链的碱基,在 ATP 驱动的过程中实现链交换。(引自 West, S.C., Annu. Rev. Biochem. 61, 618(1992))

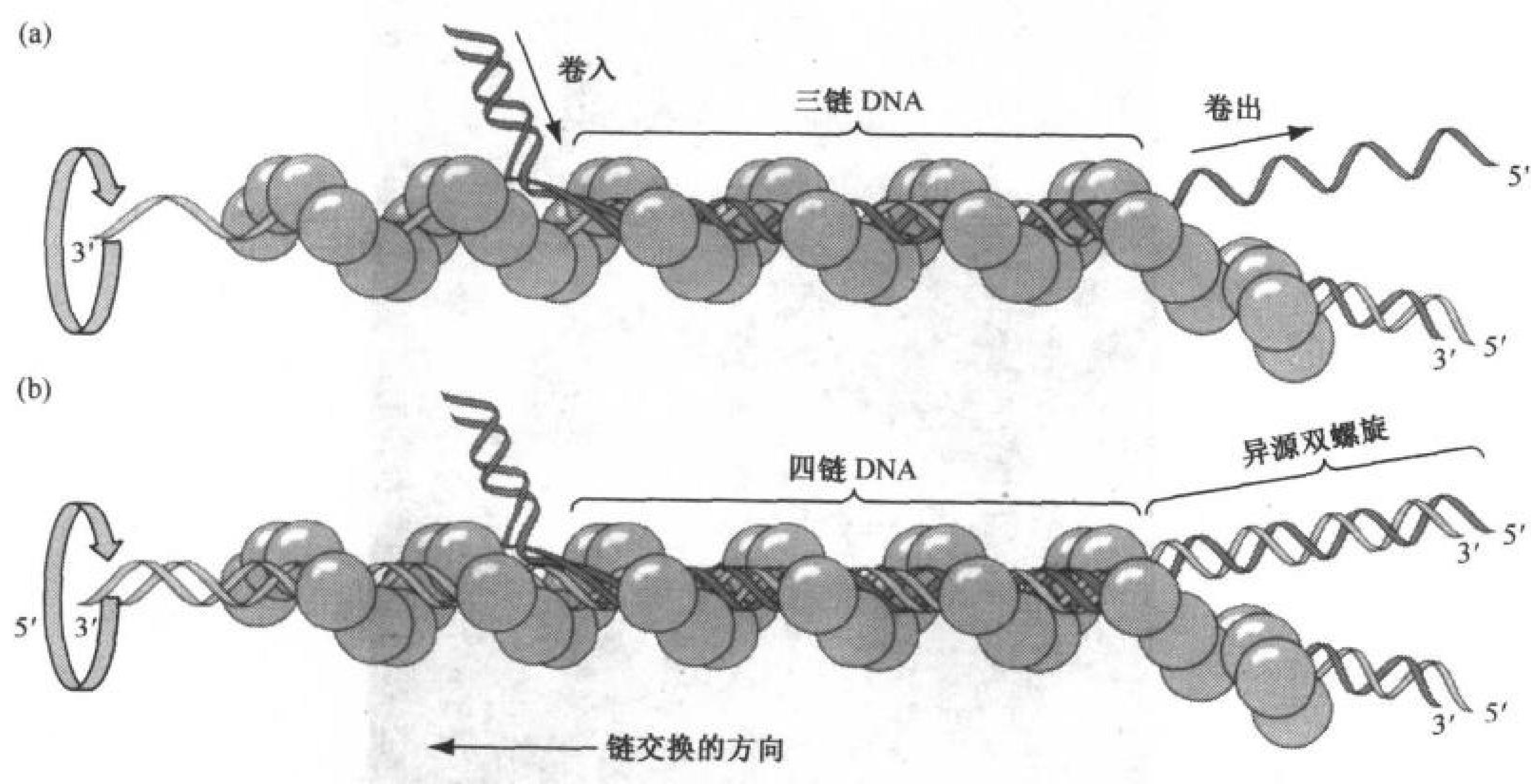


图 24-36 RecA 介导的链交换中三链和四链 DNA 螺旋模型

(a)三链螺旋。(b)四链螺旋。

RecA 细丝(紫色)围绕其螺旋轴旋转,导致双螺旋 DNA 像所画的那样从右到左被卷入细丝。b 中结构的去蛋白质化以及四链 DNA 的解体产生一个 Holliday 连接(图 24-33)。(引自 After West, S.C., Annu.Rev.Biochem, 61, 617 (1992))

参与重组的多种蛋白

除了 RecA 之外还有很多蛋白质参与了大肠杆菌的重组。RecA 所结合的单链切口是由 **RecBCD 蛋白**造成的。这种 330kDa 的蛋白质是 SOS 基因 ***recB***、***recC*** 和 ***recD*** 的产物。RecBCD 在一个由 ATP 驱动的过程中解开双链 DNA,并在由此生成的单链 DNA 上打开切口。拓扑异构酶对维持重组过程所要求的超螺旋水平是必要的。SSB 通过维持 DNA 的单链状态以及调节 RecA 功能也参与了重组。**RuvB 蛋白**(37kDa)是一个依赖 DNA 的 ATP 酶,显然它是驱动分支移位的马达,虽然它自己与 DNA 的结合力很弱。**RuvA 蛋白**(22kDa)特异性地与 Holliday 连接和 RuvB 结合,从而将 RuvB 定位到 DNA 上。**RuvC 蛋白**(19kDa)是切开两个重组双链 DNA(图 24-32j)的核酸酶。当然,DNA 连接酶在连接解体的交换连接(图 24-32l)处的 DNA 链是必需的。

805

由 David Rice 测定的大肠杆菌 RuvA 蛋白的 X 射线结构表明,这个有 209 个残基亚基的同四聚体,具有四重旋转对称(图 24-37a)。RuvA 蛋白具有类似一朵四瓣花的外观:它相当平坦(80Å × 80Å × 45Å),一面凹一面凸。其凹面具有四条沟,从四个位于中央的带负电的突出或“针”放射到一个正方形的角,四个角则带正电,并含有很多保守残基。而凸面带负电,保守度很低。因此推导出一个模型,在此模型中 Holliday 连接的双链部分结合于 RuvA 带正电的凸面的沟中,而形成四通连接的单链 DNA 片段则环绕 RuvA 的中央针(图 24-37a)。带负电的针和 Holliday 连接的阴离子磷酸基团之间的排斥力,很可能有利于单链 DNA 片段的分离。

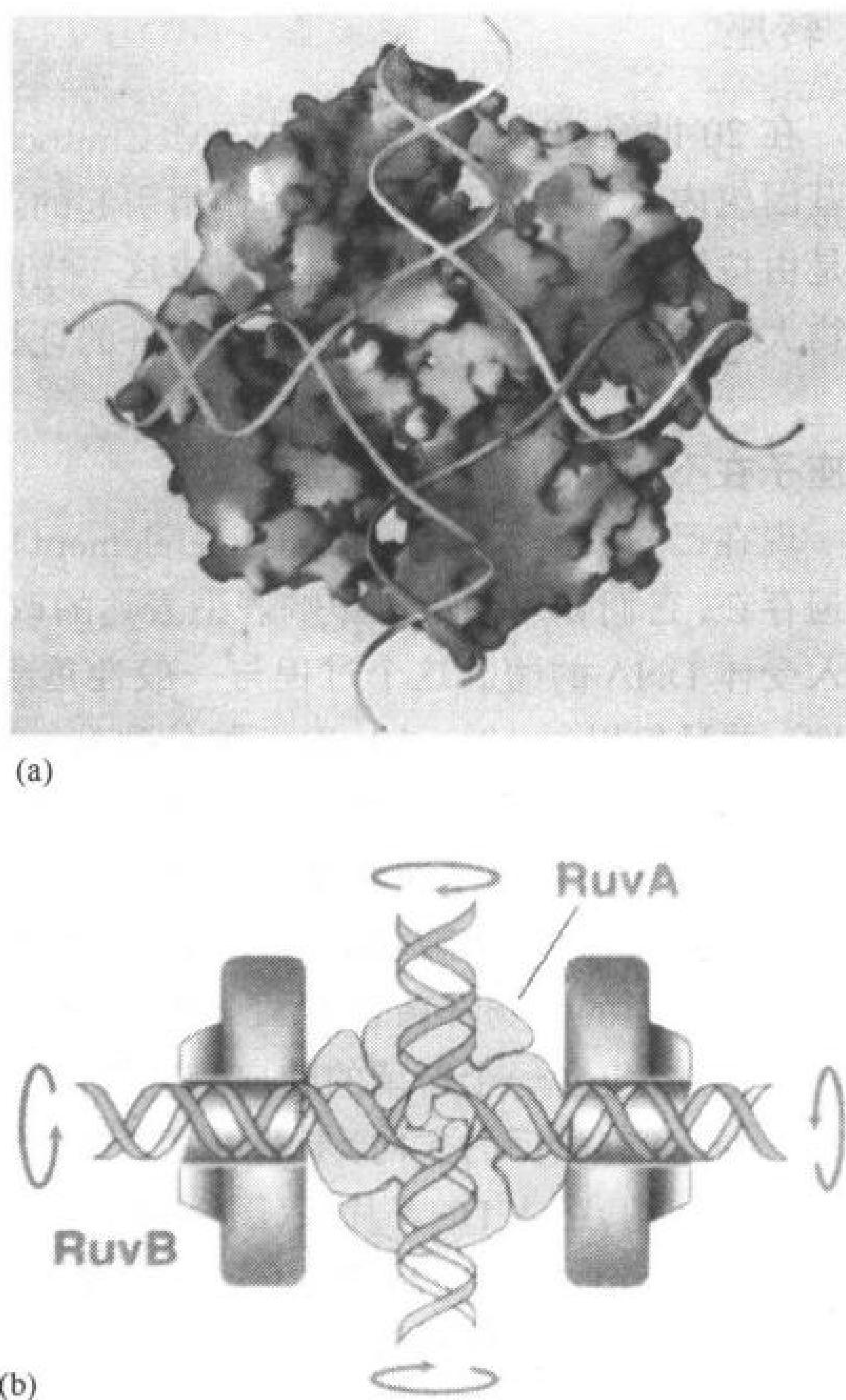


图 24-37　RuvA 作用的结构基础

(a)从四聚体的四重旋转轴往下看到的大肠杆菌 RuvA 的 X 射线结构。该蛋白质用它的溶剂可及表面表示,根据其静电势(蓝,正电;红,负电;白,中性)着色。注意环绕每个中央针的带负电的小区域。Holliday 连接 DNA,此处以红、青、绿和黄色的条带表示,在该结构中被做成模型。(b)RuvA 和 RuvB 与 Holliday 连接 DNA 的复合物在分支移动过程中的示意图。RuvA 和 RuvB 用灰色轮廓表示,RuvA 是沿其四重轴去看,如同在 a 部分一样,而两个 RuvB 六聚体环则是截面图。DNA(红色和蓝色条带)被显示穿过这些蛋白质的中心。(经英国谢菲尔德大学 David Rice 及英国诺丁汉大学 Robert Lloyd 的允许转载此图)

806

RuvA·RuvB·Holliday 连接复合物的电子显微照片提示,两个 RuvB 六聚体与 RuvA 四聚体的对角(相距 180°)接触,在此处每个都包裹了与 RuvA 结合的 Holliday 连接的一条 DNA 臂(图 24-37b)。在此复合物中,RuvB 介导的 ATP 水解可能反向旋转这些双螺旋 DNA 的主干,以一定的方式驱动分支移位(图 24-32　f)。

B. 转座

在 20 世纪 50 年代初，Barbara McClintock 报道玉米(印度玉米)粒的斑点样色素沉着是由玉米基因组内可移动的遗传元件的作用引起的。这个假说理所当然地被忽视，因为它违反了染色体是由按固定顺序连接的基因所组成这一当时被接受的正统观点。又过了 20 年后，才在另一种生物大肠杆菌中发现了可移动遗传元件的证据。

转座子在不相关的位点间移动基因

现在已知**转座元件**(transposable element)或**转座子**(transposon)在原核生物和真核生物中都普遍存在，它们在短期可以影响表型表达的改变，长期则影响进化发育。每种转座子都编码将其插入受体 DNA 的酶。这个过程与一般性重组的区别在于它不需要供体和受体 DNA 之间的同源性，并且仅以每 10^4～10^7 次细胞分裂有一次的几率发生。

已有 3 种不同复杂性的转座子的性质被阐明。

1)最简单的转座子叫做**插入序列**(insertion sequence)或 **IS 元件**。它们是细菌染色体和**质粒**(通常由几千个碱基对组成的能自主复制的环状 DNA 分子)的正常组成成分。例如，一个普通的大肠杆菌含有 8 个拷贝的 **IS1** 和 5 个拷贝的 **IS2**。IS 元件通常由<2000 碱基对组成，包含一个所谓的**转座酶基因**以及在某些情况下还有一个调节基因，其两侧为短的反向(具有相反的方向)末端重复。插入的 IS 元件的两侧则各有一个正向重复的(具有相同方向的)宿主 DNA 片段(图 24-38)。这提示 *IS 元件在一个随后被填平的错开的切口处插入宿主* DNA(图 24-39)。这个靶序列的长度(最常见的为 5～9 碱基对)，而非 IS 的序列，代表了 IS 元件的特征。

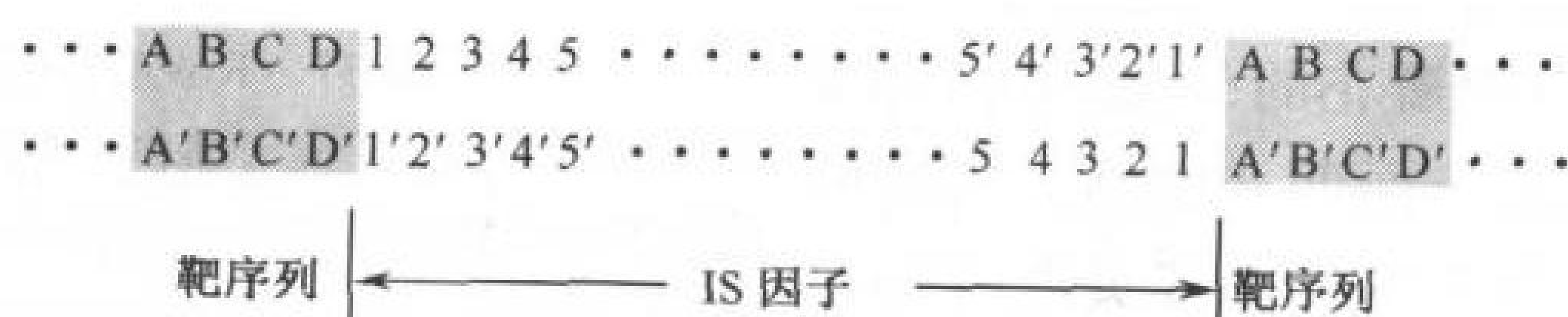


图 24-38 IS 元件的结构

这些及其他转座子具有反向末端重复(数字)，两侧为宿主 DNA 序列(字母)的正向重复。

2)*更复杂的转座子带有不参与转座过程的基因*，诸如抗生素抗性基因。例如，**Tn3**(图 24-40)含有 4957 碱基对，并各有 38 碱基对的反向末端重复。Tn3 的中央区域编码 3 种蛋白质：①一个被称为 **TnpA** 的 1015 个残基的转座酶；②一个被称为 **TnpR** 的 185 个残基的蛋白质，它阻遏 ***tnpA*** 和 ***tnpR*** 的表达，并介导转座所必需的位点特异性重组(见下文)；③一个使氨苄青霉素失活的 **β-内酰胺酶**(框 8-2)。位点特异性重组发生在一个富含 AT 的区域，即位于 *tnpA* 和 *tnpR* 之间的**内部解离位点**。

3)所谓的**复合转座子**(图 24-41)由一个含有基因的中央区域组成，其侧邻为两个相同或几乎相同的类 IS 组件，此 IS 组件具有相同或反向相对的取向。复合转座子显然来源于原本独立的两个 IS 元件的结合。实验证明，*复合转座子可以使其中央区域的任何序列发生转座*。

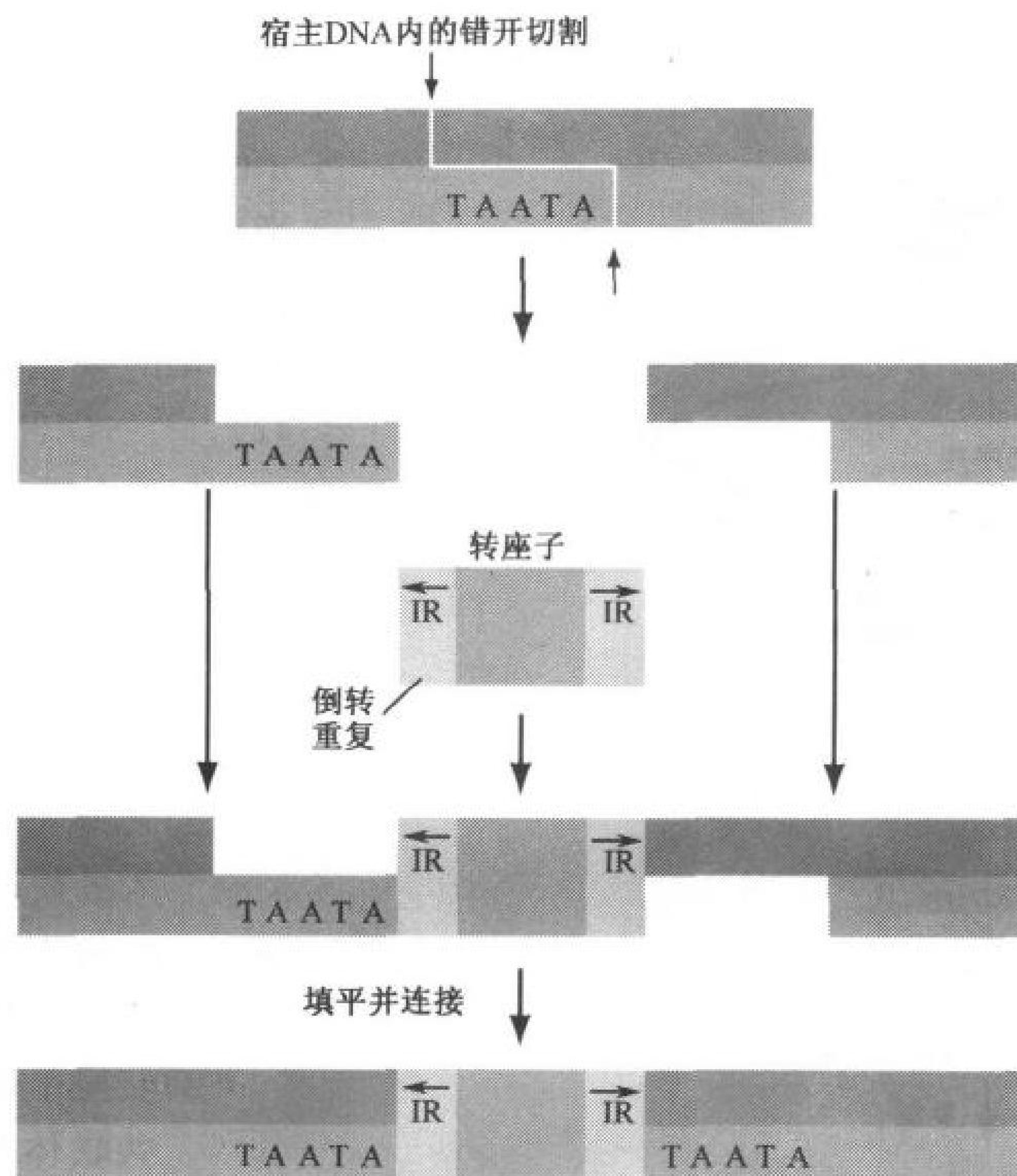


图 24-39 转座子的插入模型

一个随后被填平的错开切口产生靶序列的正向重复。

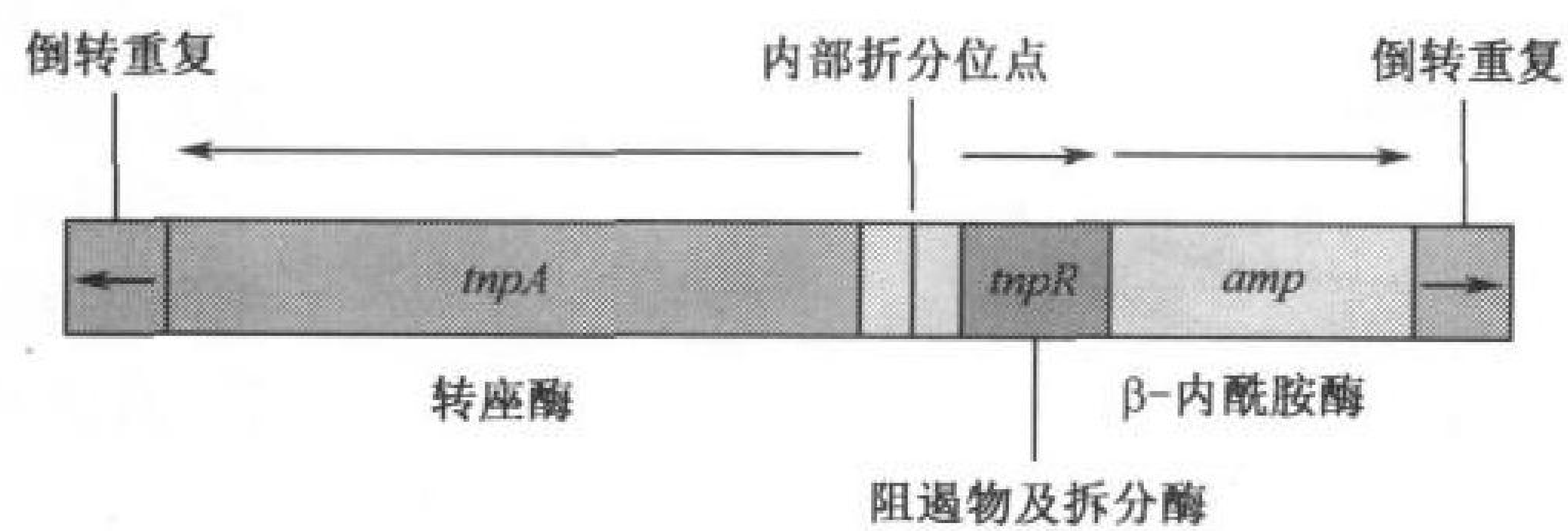


图 24-40 Tn3 转座子图谱

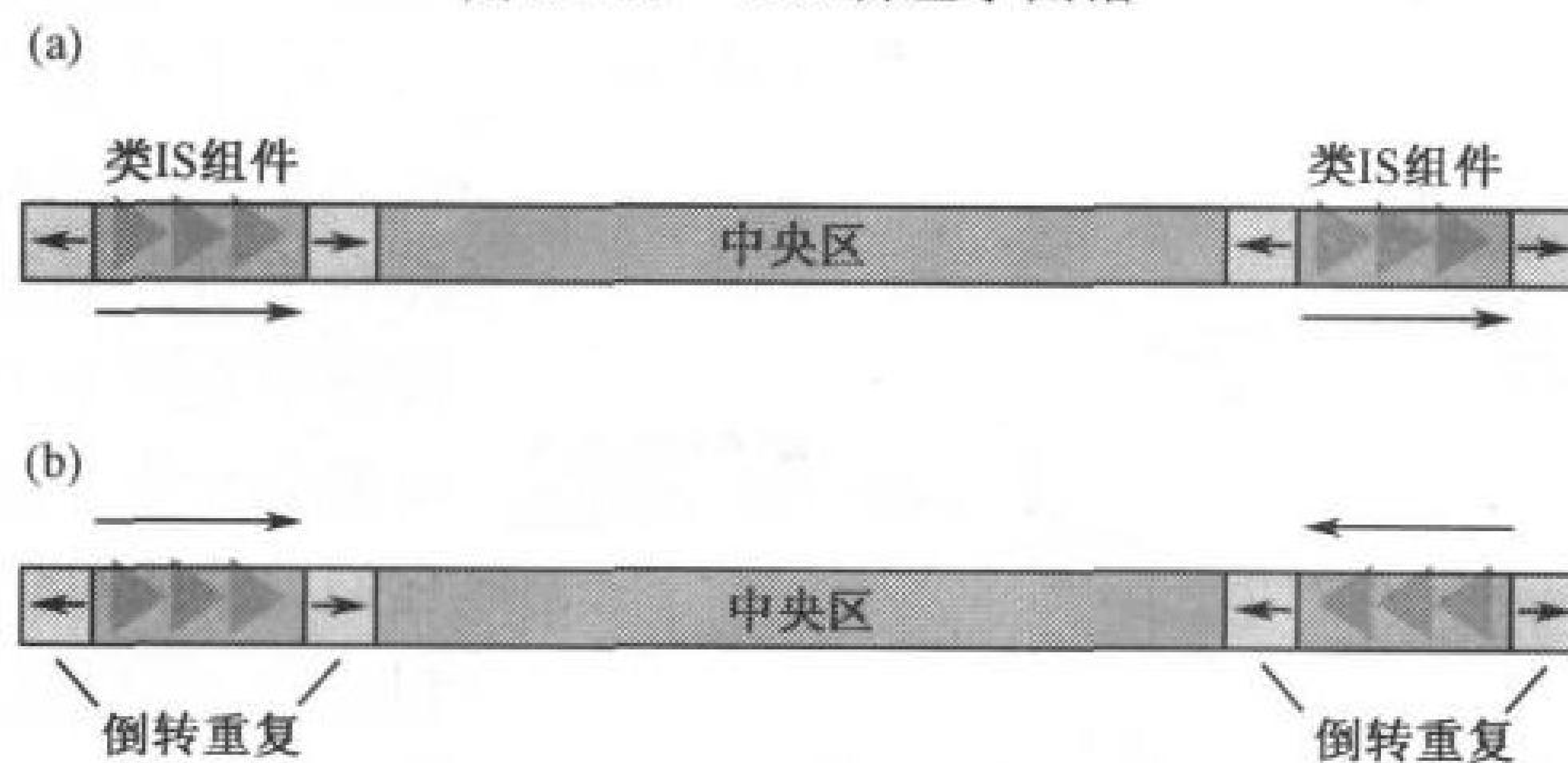


图 24-41 复合转座子

这个元件包含一个带多种基因的中央区域和侧邻的两个相同或几乎相同的类 IS 组件(绿)。类 IS 组件可以具有(a)正向或(b)反向相对的取向。

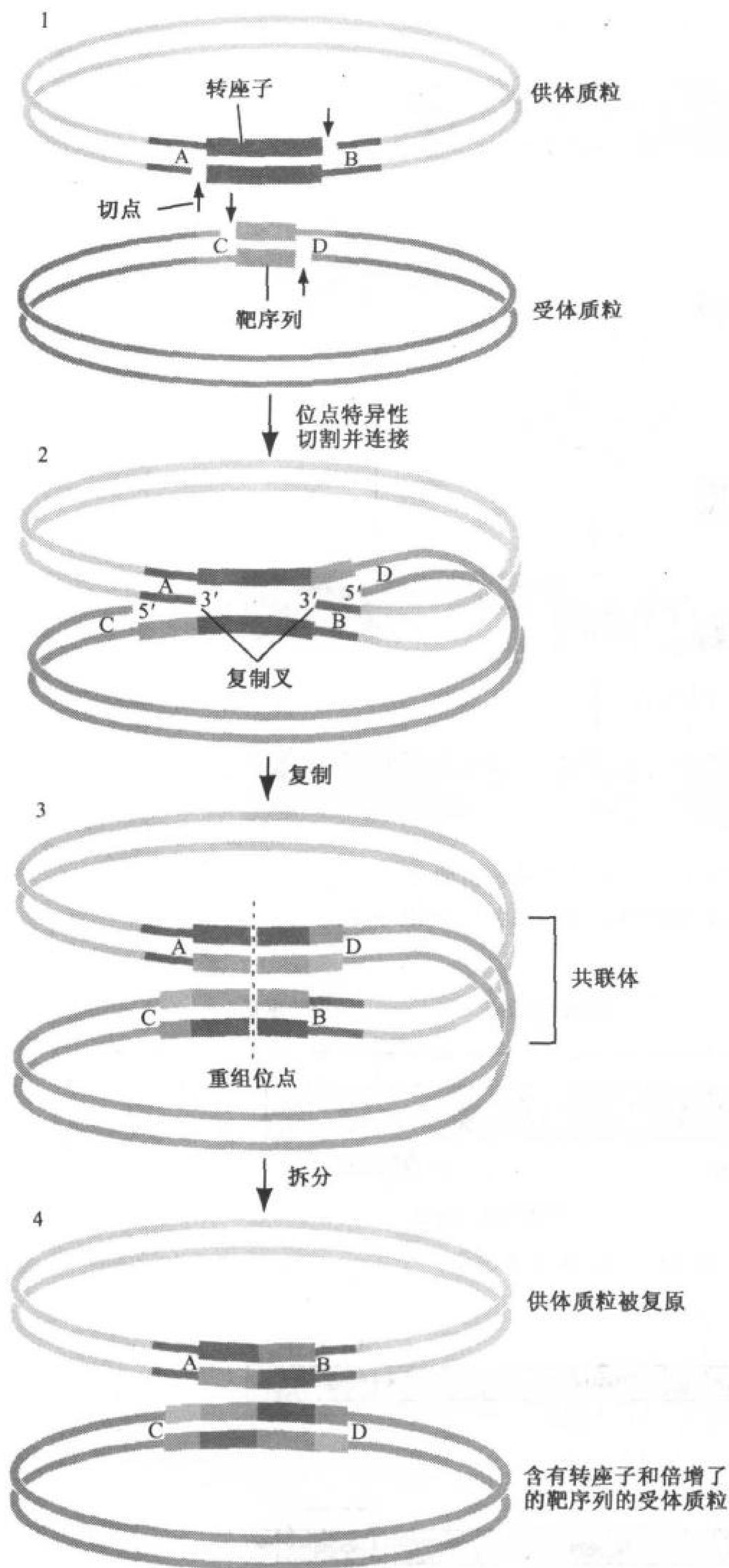


图 24-42　涉及中间阶段的共联体的转座模型
阴影较淡的条块代表新合成的 DNA。[引自 Shapiro, J.A., Proc. Natl. Acad. Sci., 76, 1934(1979)]

一个推测的转座机制

转座子并非像它们的名字所暗示的那样在一个基因组内简单地跳来跳去。相反，*转座的机制包含转座子的复制*。一个转座子在两个质粒间移动的模型包含以下步骤(图 24-42)。

1)受体质粒的靶序列处被切开一对错开的单链切口(例如在图 24-39 中)。类似地，转座子的两侧相对两条链上也产生单链切口。

2)转座子的每个自由末端在插入处被连接到伸入的单链上。这样在转座子的每个末端形成了一个复制叉。

3)转座子被复制，从而产生一个**共联体**(两个质粒的融合)。这种共联体已被分离到。

4)通过两个转座子内部的解离位点之间的位点特异性交换，共联体被解离为两个分开的质粒，每个都含有转座子。这个重组过程是由一个转座子编码的**解离酶**(在 Tn3 中是 TnpR)所催化，而不是 RecA。

转座与大量的遗传重排有关

除了介导自身插入 DNA 之外，*转座子还促使宿主 DNA 的倒向、缺失和重排*。当宿主 DNA 含有同一种转座子的两个方向相反的拷贝时，倒向就会发生。这些转座子的重组，使它们之间的区域倒向(图 24-43a)。相反地，如果这两个转座子具有相同的方向，重组则使它们之间的片段缺失(图 24-43b)。一段染色体以这种方式被缺失，再通过一个不同的重组事件，在另一个位点上整合到染色体

中，就导致染色体的重排。

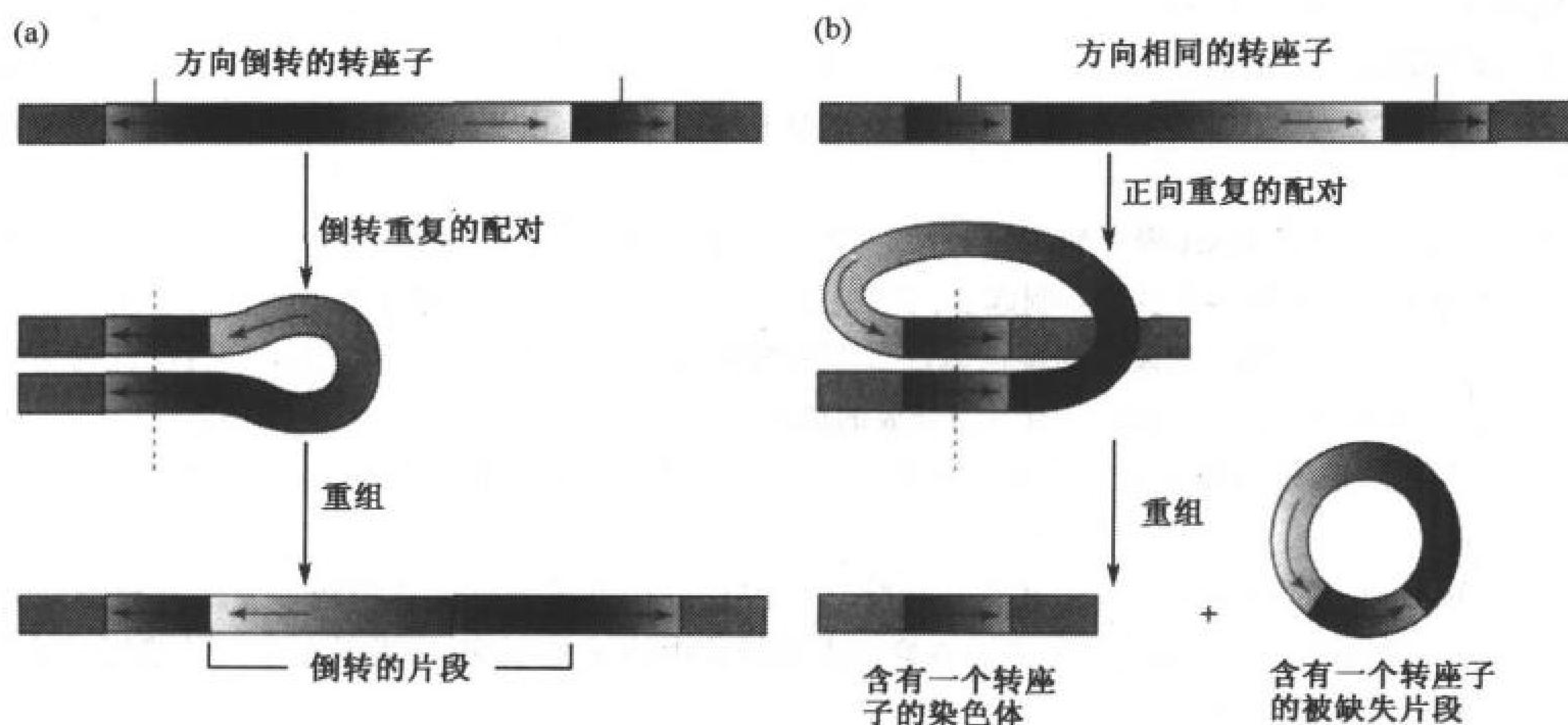


图 24-43　通过重组的染色体重排

(a)两个具有反向的相同转座子之间的一个 DNA 片段的倒向。(b)两个具有同向的相同转座子之间的一个 DNA 片段的缺失。

转座子可被视为自然界的基因工程“工具”。例如，自从抗生素普遍使用以来，好几种对抗生素(节 3-5A)具有抗性的质粒的快速进化，就是由于相应的抗生素抗性转座子在这些质粒中的积累。转座子介导的重排，可能还与连接两个原来独立的基因片段而产生新蛋白质有关。此外，转座子显然还能介导遗传信息在不相关物种间的转移。

809

类似反转录病毒的真核生物转座子

转座子存在于亲缘关系很远的真核生物中，例如酵母、玉米和果蝇。实际上，果蝇基因组的约 3%是由分布在不同位点的转座子构成的。

反转录病毒将其单链 RNA 基因组拷贝为双链 DNA(框 24-2)，它在转录发生之前随机插入宿主的染色体中。许多真核生物的转座子和反转录病毒的相似序列(以及它们与细菌的转座子不相似)，提示这些转座子是退化的反转录病毒。它们因此被称为**反转录转座子**(retrotransposon)。反转录转座子的转座开始于其转录为 RNA，然后通过反转录酶从 RNA 模板合成 DNA。和反转录病毒感染一样，新合成的 DNA 随后随机地插入宿主基因组中。

小　结

1. DNA 通过 DNA 聚合酶的作用，以分开的亲链为模板，合成互补的子链，从而被半保留复制。
2. 复制是半不连续性的，前导链被连续合成，而后随链被合成为冈崎片段，它们的合成由 RNA 引发，随后被再连接。
3. 大肠杆菌聚合酶 I 除了其 5′→3′ 聚合酶活性外，还有 3′→5′以及 5′→3′外切核酸酶活性。这使它能发挥切除 RNA 引物并以 DNA 取代它们，以及参与 DNA 损伤修复的生理功能。
4. 由 10 种不同亚基组成的 Pol III 是大肠杆菌的复制酶。其 β 亚基像一个滑动的夹子，将 Pol III 固定在正在复制的 DNA 上，因而提高 Pol III 的进行性。两个 Pol III 组合形成一个复制体。
5. 为了起始复制，亲链首先在一个特定的区域被熔解分开，并被解旋酶进一步解开。SSB 防止单链重新退火，含

有引发酶的引发体合成 RNA 引物。

6. 由于 DNA 聚合酶只能沿 5′→3′方向复制，因此后随链模板必须向复制体折回成环。在大肠杆菌中，Pol III 介导的复制从复制起始点 *oric* 处双向前进，直到两个沿相反方向运动的复制叉在方向相背的 Ter 序列之间会合。
7. DNA 复制的高度忠实性由 dNTP 的水平调节，由需要 RNA 的引发，由 3′→5′校对，以及 DNA 的修复机制而得以实现。
8. 真核生物含有至少 5 种 DNA 聚合酶，每一种都具有与大肠杆菌 DNA 聚合酶 I 的 Klenow 片段一样的手状外形。在真核生物中，复制具有多个复制起点，它们被编组在复制子中，并且通过核小体进行复制。
9. 为了复制后随链的 5′末端，真核生物染色体以重复的端粒序列作为结尾，它们是由端粒酶这种核糖核蛋白加上的。每条染色体末端的 3′ 延伸作为引物合成的模板。
10. 核苷酸序列的突变，通过复制错误或通过化学诱变剂的作用而自发产生。在 Ames 试验中诱变的许多化合物也是致癌的。
11. 某些形式的 DNA 损伤（例如烷基化碱基和嘧啶二聚体），可在单独一步反应中被回复。在核苷酸切除修复中，一段含有损伤的寡核苷酸被去掉并被置换。大肠杆菌中的 SOS 反应，激发易于出错的修复。重组修复可以恢复已经被复制的损伤 DNA。
12. 在一般性重组中，同源 DNA 片段的链发生交换，这涉及一种可由两种途径被解离的交换结构（Holliday 连接）。大肠杆菌 RecA 聚集于 DNA 上，从而促使通过三链或四链中间体，进行依赖 ATP 的链交换。重组也要求蛋白质解开 DNA 产生切口，维持适当的超螺旋，驱动分支移位，解离 Holliday 连接体以及连接 DNA 片段。
13. 转座子是涉及复制机制的遗传元件，可在一个基因组内移动。转座子介导宿主 DNA 的重排。

参考文献

DNA 复制

Arnold, E., Ding, J., Hughes, S.H., and Hostomsky, Z., Structures of DNA and RNA polymerases and their interactions with nucleic acid substrates, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **5,** 27–38 (1995).

Brautigan, C.H. and Steitz, T.A., Structural and functional insights provided by crystal structures of DNA polymerases and their substrate complexes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8,** 54–56 (1998).

DePamphilis, M.L., Origins of DNA replication in metazoan chromosomes, *J. Biol. Chem.* **268,** 1–4 (1993).

Herendeen, D.R. and Kelly, T.J., DNA Polymerase III: Running rings around the fork, *Cell* **84,** 5–8 (1996).

Kelman, Z. and O'Donnell, M., DNA polymerase III holoenzyme: Structure and function of a chromosome replicating machine, *Annu. Rev. Biochem.* **64,** 171–200 (1995).

Kong, X.-P., Onrust, R., O'Donnell, M., and Kuriyan, J., Three-dimensional structure of the β subunit of E. coli DNA polymerase III holoenzyme: A sliding DNA clamp, *Cell* **69,** 425–437 (1992).

Kornberg, A. and Baker, T.A., *DNA Replication* (2nd ed.), Freeman (1992). [A compendium of information about DNA replication.]

Sousa, R., Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases, *Trends Biochem. Sci.* **21,** 186–190 (1996).

Waga, S. and Stillman, B., The DNA replication fork in eukaryotic cells, *Annu. Rev. Biochem.* **67,** 721–751 (1998).

DNA 损伤与修复

Lindahl, T., Instability and decay of the primary structure of DNA, *Nature* **362,** 709–715 (1993). [Discusses spontaneous damage to DNA.]

Modrich, P. and Lahue, R., Mismatch repair in replication fidelity, genetic recombination and cancer biology, *Annu. Rev. Biochem.* **65,** 101–133 (1996).

Sancar, A., DNA excision repair, *Annu. Rev. Biochem.* **65,** 43–81 (1996).

Shore, D., Telomerase and telomere-binding protein: controlling the end game, *Trends Biochem. Sci.* **22,** 233–235 (1997).

Siegfried, Z. and Cedar, H., DNA methylation: A molecular lock, *Curr. Biol.* **7,** R305–R307 (1997).

Tanaka, K. and Wood, R.D., Xeroderma pigmentosum and nucleotide excision repair of DNA, *Trends Biochem. Sci.* **19,** 83–86 (1994).

Verdine, G.L., The flip side of DNA methylation, *Cell* **76,** 197–200 (1994).

Verdine, G.L. and Bruner, S.G., How do DNA repair proteins locate damaged bases in the genome, *Chem. Biol.* **4,** 329–334 (1997).

Wood, R.D., DNA repair in eukaryotes, *Annu. Rev. Biochem.* **65,** 135–167 (1996).

重组与转座

Egelman, E.H., What do X-ray crystallographic and electron microscopic structural studies of RecA protein tell us about recombination? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **3,** 189–197 (1993).

Grindley, N.D.F. and Leschziner, A.E., DNA transpositions: from a black box to a color monitor, *Cell* **83,** 1063–1066 (1995). [Describes the mechanism of transposition and the structure and function of transposases.]

Ohtsubo, E. and Sekine, Y., Bacterial in sertion sequences, *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* **204,** 1–26 (1995).

Rice, D.W., Rafferty, J.B., Artymiuk, P.J., and Lloyd, R.G., Insights into the mechanisms of homologous recombination from the structure of RuvA, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7,** 798–803 (1997).

Shinagawa, H. and Iwasaki, H., Processing the Holliday junction in homologous recombination, *Trends Biochem. Sci.* **21,** 107–111 (1996).

关 键 词

θ 结构 θ structure
复制叉 replication fork
冈崎片段 Okazaki fragment
脉冲标记 pulse-labeling
前导链 leading strand
后随链 lagging strand
连接酶 ligase
引物 primer
切口平移 nick translation
进行性 processivity
校对 proofreading
解旋酶 helicase
单链结合蛋白 SSB
引物体 primosome
引物酶 primase
复制体 replisome
平端连接 blunt end ligation
复制子 replicon
端粒 telomere
端粒酶 telomerase
核糖核蛋白 ribonucleoprotein
G-四套件 G-quartet
诱变剂 mutagen
嘧啶二聚体 pyrimidine dimer
点突变 point mutation
转换 transition
颠换 transversion
插入/缺失突变 insertion/deletion mutation
致癌剂 carcinogen
Ames 试验 Ames test
光复活作用 photoreactivation
核苷酸切除修复(NER) nucleotide excision repair (NER)
DNA 糖基化酶 DNA glycosylase
AP 位点 AP site
SOS 反应 SOS response
一般性重组 general recombination
重组修复 recombination repair
异源 DNA heterologous DNA
Holliday 连接 Holliday junction
分支移位 branch migration
转座子 transposon
IS 元件 IS element
反向重复 inverted repeat
正向重复 direct repeat
内邻解离位点 internal resolution site
复合转座子 composite, transposon
质粒 plasmid
共联体 cointegrate
反转录病毒 retrovirus
反转录转座子 retrotransposon

学习思考题

1. 说明 DNA 是如何半保留、双向及半不连续复制的。
2. 简述 RNA 在复制后随链及线状染色体末端中的作用。
3. 描述大肠杆菌 DNA Pol I 三种催化活性的功能。
4. β 夹子和 PCNA 的作用是什么?
5. DNA 复制所必需的哪些反应是由 ATP 水解驱动的? 不依赖 ATP 的反应是由什么驱动的?
6. DNA 复制的高度忠实性来源于什么?
7. 真核生物和原核生物的 DNA 复制有何不同?
8. 描述端粒的结构和功能。
9. 列举可能引起突变的一些途径。
10. 区别直接的 DNA 修复和 NER 的总体特征。

11. 描述一般性重组的步骤。

12. 哪些蛋白活性是支持重组所必需的。

13. 转座子是如何介导遗传重排的?

练　习　题

1. 在大肠杆菌染色体的复制中大约有多少个冈崎片段被合成?

2. 解释为什么一种能沿 3′→5′方向合成 DNA 的 DNA 聚合酶具有选择劣势,即使它具有 5′→3′校对活性。

3. 为什么没有完全丧失 5′→3′外切核酸酶活性的 Pol I 突变体?

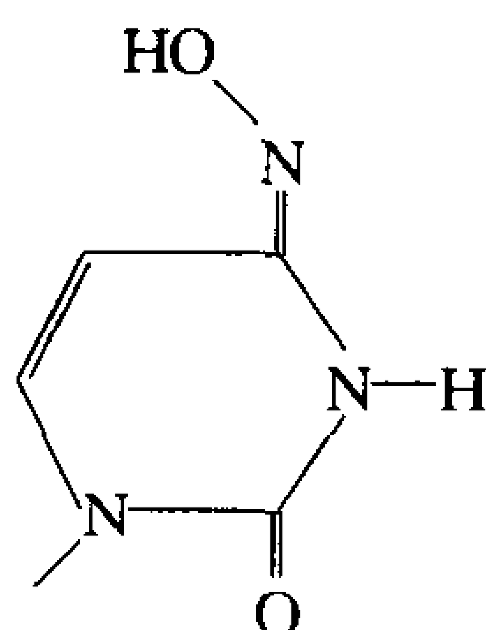
4. 为什么在 DNA 测序反应中(节 3-4C)只用 Klenow 片段比完整的大肠杆菌 Pol I 要好?

5. 解释为什么在复制叉处由解旋酶进行的 DNA 的高效解链中 DNA 旋转酶是必需的。

6. 为什么观察到的大肠杆菌每复制一个碱基的突变率是 10^{-8}～10^{-9},虽然 Pol I 和 Pol III 每合成一个碱基的错误率为 10^{-6}～10^{-7}?

7. 为什么线状双链 DNA,例如 T7 噬菌体 DNA,不可能只由大肠杆菌编码的蛋白质全部复制?

8. 羟胺(NH_2OH)将胞嘧啶转变为如下化合物:这个修饰了的胞嘧啶残基与哪个碱基配对? 它产生的是转换还是颠换突变?



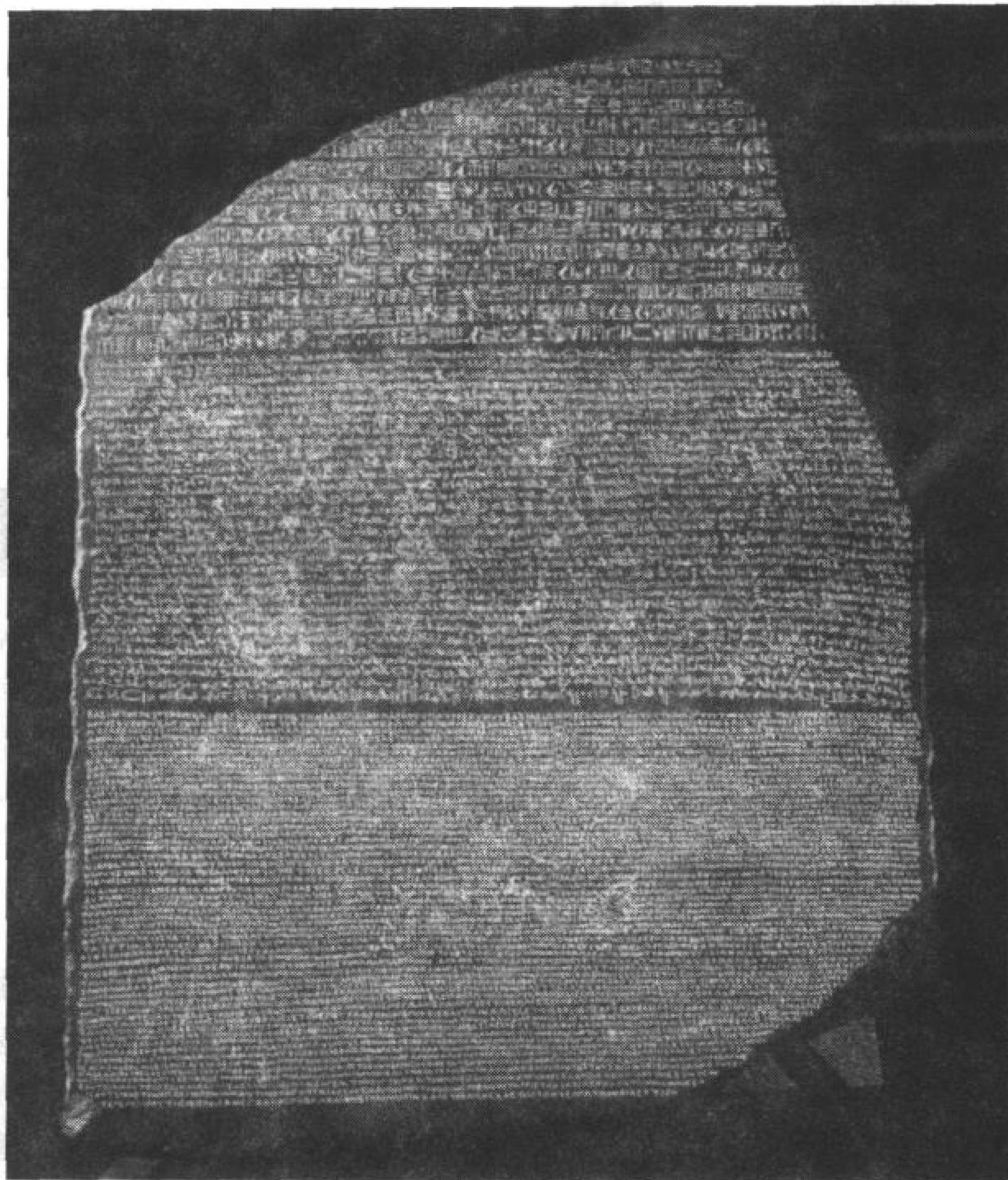
9. 大肠杆菌染色体上的某些位点被称为热点,因为它们通常具有很高的点突变率,这些位点中的许多都含有一个 5-甲基胞嘧啶残基。解释这种热点存在的原因。

10. 预测下列大肠杆菌基因的缺失是否致死? (a) *dnaB*;(b) *polA*;(c) *ssb*;(d) *recA*。

11. 在大肠杆菌中,所有新合成的 DNA 看起来都是一段一段的(这种观察可被阐述为意味着前导链和后随链都是不连续复制的)。然而,在尿嘧啶 *N*-糖基化酶缺陷的大肠杆菌突变体中只有约一半的新合成的 DNA 是一段一段的。解释原因。

(南京大学　江雪源　译)

第 25 章　转录与 RNA 加工



一个细胞的转录机器阅读 DNA 模板不连续的部分。DNA 分子中包含的信息，就像这块玫瑰石一样，必须首先进行解码，这种解码过程就是指导细胞蛋白质的合成。(照片经允许复制自大英博物馆)

1. RNA 聚合酶
   A. 酶的结构
   B. 与模板结合
   C. 链的延长
   D. 链的终止
2. 真核生物的转录
   A. 真核 RNA 聚合酶
   B. 真核启动子
   C. 转录因子
3. 转录后加工
   A. 信使 RNA 的加工
   B. 核糖体 RNA 的加工
   C. 转移 RNA 的加工

814 显微镜学者 19 世纪 30 年代指出，真核细胞的 DNA 几乎毫无例外地存在于细胞核中。50 年代证实掺入蛋白质的放射性同位素标记的氨基酸，存在于细胞质 RNA-蛋白质复合物核糖体中。因此*蛋白质的合成不是直接由 DNA 指导，因为至少在真核细胞中，DNA 与核糖体从不直接接触*。在 DNA 与蛋白质合成机器之间有一中介物，就像 Francis Crick 在分子生物学中心法则中指出的，它就是 RNA(节 3-3B)。

细胞含有 3 种主要类型的 RNA：**核糖体 RNA**(rRNA)，它占核糖体质量的三分之二；**转移 RNA**(tRNA)，一组结构紧密的小分子，它们运送氨基酸到核糖体，用于合成蛋白质；**信使 RNA**(mRNA)，它的核苷酸顺序指导蛋白质的合成。另外，还有一群小分子 RNA，它们在新转录的 RNA 分子的加工中起着十分重要的作用。所有 RNA 都能与同一有机体的 DNA 的互补序列相杂交。总之，*细胞中的所有 RNA 都是从 DNA 模板转录而来*。

DNA 到 RNA 的转录由 **RNA 聚合酶**(RNA polymerase)催化，它像催化 DNA 复制的 DNA 聚合酶一样，是一个多亚基的复合物。本章我们将讨论 RNA 聚合酶的催化特性和这些蛋白质如何瞄准特殊的基因。而 DNA 聚合酶，却没有这种靶向性。我们还将讨论新合成的 RNA 如何加工成为具有完全功能的分子。

1. RNA 聚合酶

RNA 聚合酶是催化 DNA 指导的 RNA 合成的酶，是在 1960 年由 Samuel Weiss 和 Jerard Hurwitz 两人独立发现的。这个酶在模板 DNA 上将核糖核苷三磷酸(NTPs)ATP、CTP、GTP 和 UTP 连接在一起，并发生如下的反应：

$$(\text{RNA})_{n\text{个残基}}+\text{NTP}\rightleftharpoons(\text{RNA})_{n+1\text{个残基}}+\text{PP}_i \xrightarrow{H_2O} 2\text{P}_i$$

这一反应中由于 PP_i 的释放和 PP_i 的继续水解而向前推进。

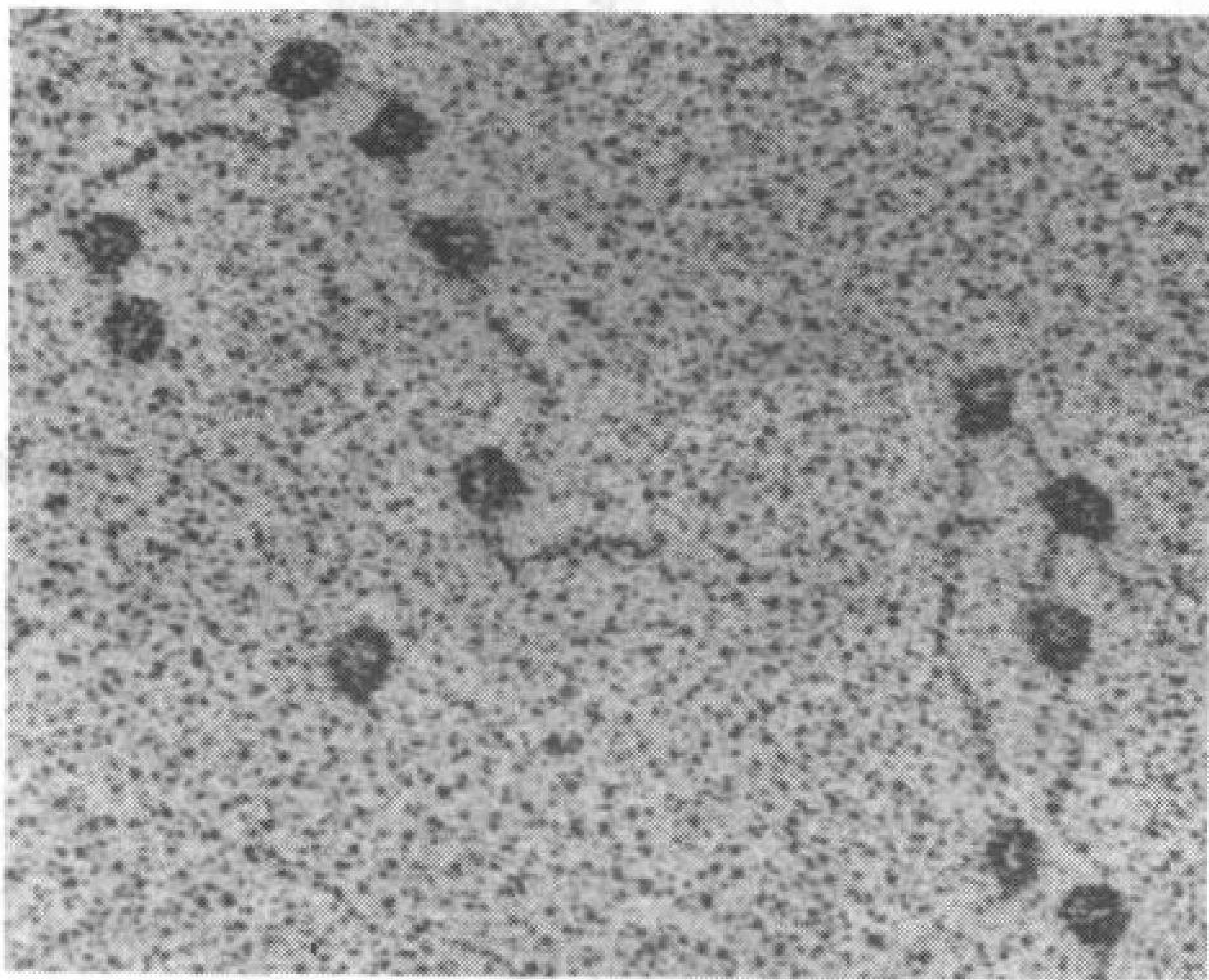


图 25-1 *E. coli* RNA 聚合酶全酶的电镜图
这是一种已知最大的可溶性酶，它与噬菌体 T7 DNA 上的不同启动子相连接。[引自 Williams, R. C., Proc. Natl. Acad. Sci. 74, 23R(1977)]

所有的细胞都有 RNA 聚合酶。在细菌中，一种酶合成细胞的所有 RNA，除了用于 DNA 复制的短 RNA 引物以外(节 24-2B)。真核细胞则有 4 种或 5 种 RNA 聚合酶，每一种酶合成一种不同的 RNA。我们将先讨论 *E. coli* 的聚合酶，因为它是研究得最清楚的 RNA 聚合酶。

A. 酶的结构

E. coli RNA 聚合酶的**全酶**(holoenzyme)是一个约 449kDa 的蛋白质，它由 $\alpha_2\beta\beta'\sigma$ 亚基组成。RNA 合成一旦启动，σ 亚基(亦叫 **σ 因子**)就从**核心酶**(core enzyme)$\alpha_2\beta\beta'$ *上解离*，核心酶进行实际的聚合过程。RNA

聚合物的大小足以在电子显微镜下清楚看到(图25-1)。其β′亚基含有2个Zn^{2+},它们被认为参与聚合反应。活性酶还要求有Mg^{2+}。

Roger Kornkerg用电子结晶学技术测定了*E. coli* RNA聚合酶的低分辨率结构(图25-2a),这个酶的最显著的特征是其拇指状突出,它构成一个长55Å,直径约25Å的圆柱形沟槽的侧壁,这个沟槽空间可容纳B-DNA的16bp。RNA聚合酶与DNA聚合酶(节24-2A)和反转录酶(框24-2)都具有"手"状结构。相对较小的T7噬菌体RNA聚合酶(99kDa)(图25-2b)的X射线衍射研究表明,在RNA链伸长过程中,DNA结合沟槽的拇指闭合起来。

815

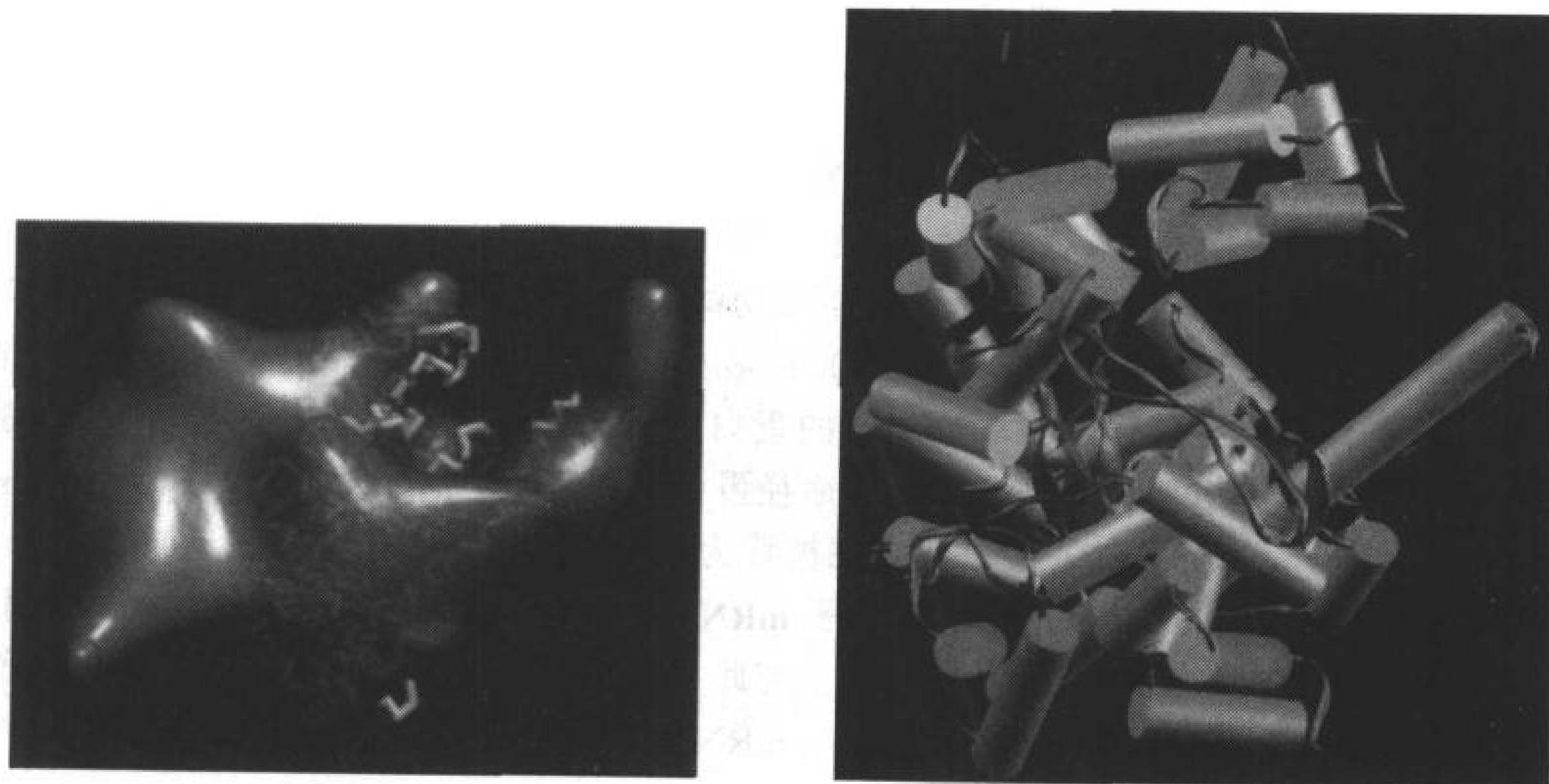


图25-2　RNA聚合酶的结构

(a)电子结晶学技术测得的分辨率为22.7Å的*E. coli* RNA聚合酶的结构。这个形状不规则的酶(蓝色)的大小约是100Å×100Å×160Å,显示为宽25Å,长55Å的圆柱形沟。注意:拇指状突出(右边)构成这一结合DNA沟漕的侧边。相似取向的DNA聚合酶I Klenow片段的C_α骨架(黄色)叠加在图上。(b)T7 RNA聚合酶X衍射结构与图(a)的*E. coli* RNA聚合酶低分辨率结构的取向相拟合,橙色圆柱是螺旋,绿色箭头为β折叠,蛋白质的其他部分为蓝色。单体蛋白的其他部分在电子密度图上不表现,因此多肽链显出不连续状。(引自Pittsburgh大学Rui Sousa和Bi-Cheng Wang提供的X射线结构)

B. 与模板结合

816

RNA的合成一般只在DNA模板的特异位点上起始。与DNA复制相反,复制要求染色体两条链同时进行完全复制,而遗传信息的正常表达却只包含基因组中某些更小的单链区域。作为转录模板的DNA链,一般称之为**反义链**(antisense)或**非编码链**(noncoding strand),因为它的核苷酸序列与RNA互补。另一条核苷酸序列与转录的RNA序列相同的DNA链称之为**有义链**(sense shand)或**编码链**(coding strand)(图25-3)。因此生物体染色体上的两条DNA链能包含不同的基因组合。

请记住"基因"是一个比较不严密的术语,它是指编码多肽链的序列和编码相应rRNA、tRNA和其他RNA的序列。而且习惯上基因还包括参与起始和终止转录和翻译的序列,这些序列实际上没有被转录(或翻译)。许多基因的表达也依赖于调控序列,这些序列不直接在编码区,而

可能在一定的距离之外。

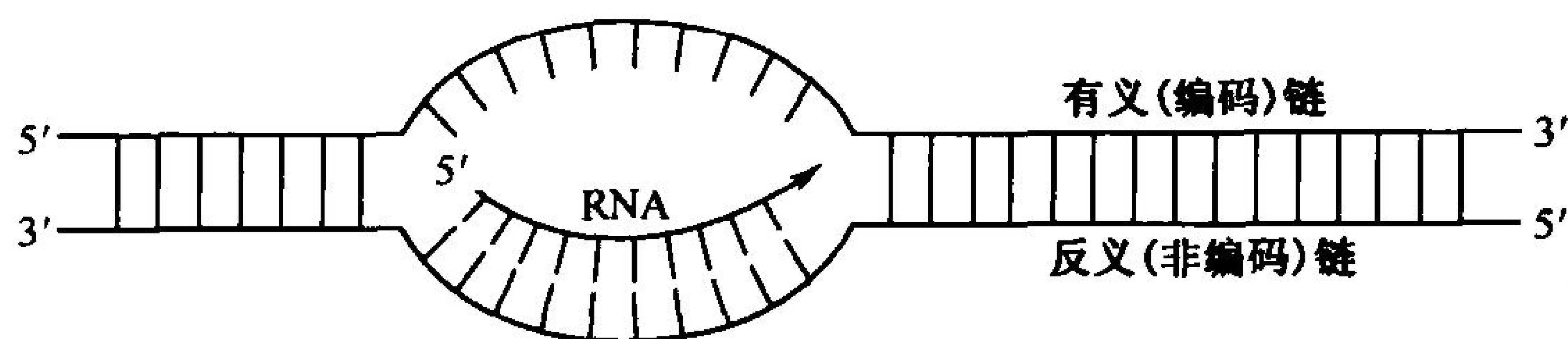


图 25-3 有义和反义 DNA 链
双螺旋 DNA 的模板链称之为它的反义链或非编码链，其有义链或编码链与被转录的 RNA 有相同的序列和取向。

真核生物大多数蛋白质的编码基因[称为**结构基因**(structural gene)]是逐个被转录的。但在原核生物基因组中，一些基因往往在一条链上纵向一字排开，因而它们能一起被转录。这些遗传单位称为**操纵子**(operon)，它们一般包含相关功能的一些基因。例如 *E. coli* 的 3 种不同的 rRNA 基因存在于同一个操纵子中(节 25-3B)，*E. coli* 的**乳糖操纵子**(*lac* operon)的表达在节 27-1A 有详细的描述，它包含编码参与乳糖代谢的蛋白质的 3 个基因及其表达的调控序列(图 25-4)。其他一些操纵子包含编码参与合成代谢途径蛋白质的基因，如**色氨酸操纵子**(*trp* operon)，它有 6 个**基因产物**(gene product，蛋白质往往被称为基因产物)，催化色氨酸的合成。一个操纵子往往以一个整体单位被转录，生成**多顺反子 mRNA**(poycistronic mRNA)，指导每一个编码蛋白质几乎同步合成(**cistron** 是基因的同义词)。与此相反，真核生物的结构基因不是操纵子的一部分，它只生成**单顺反子 mRNA**(monocisyronic mRNA)。

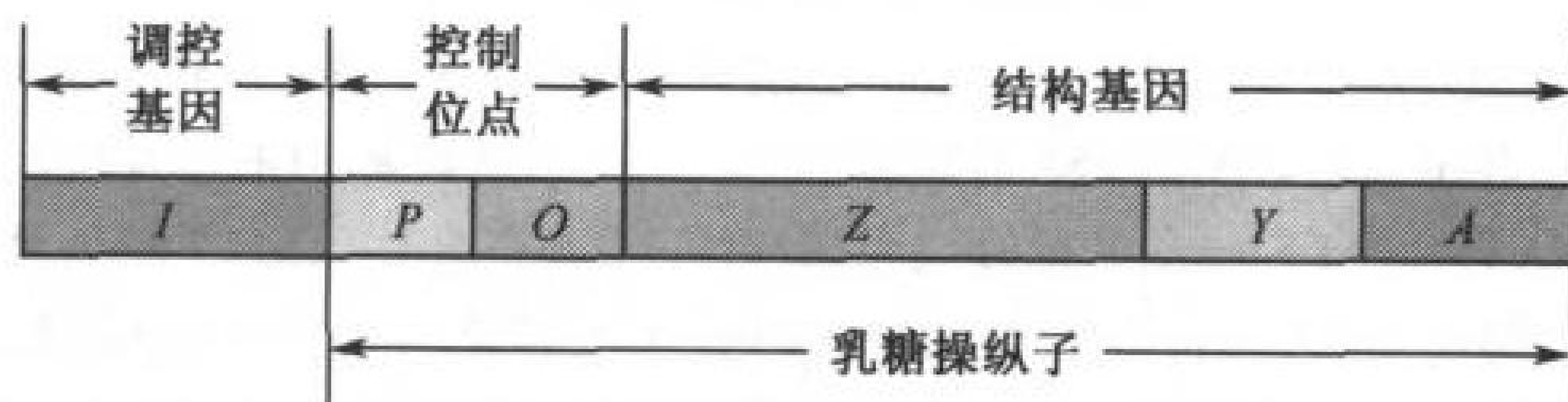


图 25-4 *E. coli* 的乳糖操纵子
这个 DNA 包含编码参与乳糖代谢的蛋白质的基因和调控其表达的遗传位点。*Z*～*Y* 和 *A* 基因相应于 β-半乳糖苷酶、乳糖渗透酶和硫半乳糖苷转乙酰酶的编码基因，紧密相连的调控基因 *I*，它不是乳糖操纵子的成员，它编码抑制乳糖操纵子转录的阻遏蛋白。

RNA 聚合酶全酶与启动子结合

RNA 聚合酶是怎样识别正确的 DNA 链并在基因(或操纵子)的起点启动 RNA 的合成呢？RNA 聚合酶通过称为**启动子**(promoter)的碱基序列与起始位点结合，启动子由聚合酶的 σ 因子识别。通过能增强或减缓某一特殊基因转录速度的突变的发现才揭示了启动子的存在。启动子是有约 40 个碱基对的一段序列，它位于转录起始位点的 5′端，这一 DNA 序列在有义链上(非模板链)，因此它与被转录的 RNA 有相同的序列和方向。启动子区域的碱基对用一个正数或负数来编号，以表示它的位置及它在 RNA 聚合酶转录方向的上游或下游。从转录为 RNA 的第一个核苷酸开始，这个起始位点为 +1，因此没有 0。因为 RNA 合成的方向是 5′→3′方向(节 25-1C)，

因此启动子位于 RNA 的起始核苷酸的上游。

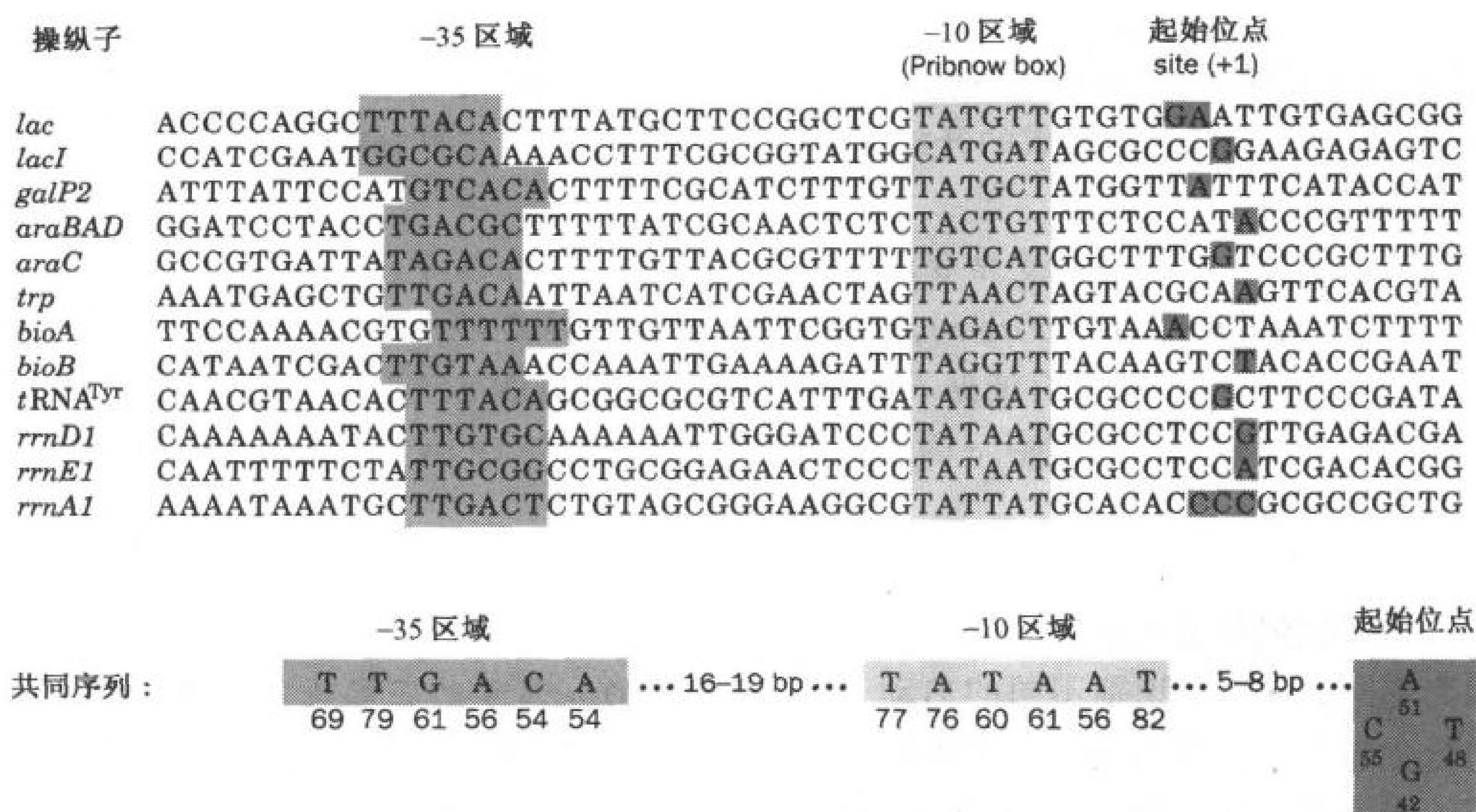


图 25-5　一些 *E.coli* 启动子的有义(编码)链的序列

约在 -10 位置的 6 碱基对区域(红影)和在 -35 区域的一个 6 碱基对序列(蓝影)，它们都是保守的。转录的起始位点(+1)标成绿影，它们在大多数启动子中只是单个嘌呤核苷酸。下面一行表示 298 个 *E.coli* 启动子的共同序列，在每一个核苷酸下面的数字是它们出现的百分数。[引自 Rosenberg, M. 和 Court, D., Annu. Rev. Genet. B, 321～323(1979)。共有序列来自 Lisser, D. and Margalit, H., Nucletc Acids Res. 21, 1512(1993)]

全酶与启动子形成紧密的复合物(其解离常数 $K \approx 10^{-14} \mathrm{mol \cdot L^{-1}}$)，这种紧密的结合可以用一个实验来揭示，即在试管中全酶能保护被结合的 DNA 片段免受 DNA 酶 I 的水解作用。从一些 *E.coli* 基因被保护区域的序列测定表明，*E.coli* 启动子序列都是“共同”(consensus)的序列(图 25-5)。它们的最“保守”序列是一个六聚体，它的中心位于 -10 位置(根据 1975 年发现它的学者 David Pribrow 的名字有时被称为 **Pribnow 框**)，它的序列为 TATAAT，其起始的 AT 和终末的 T 是高度保守的。约在上游 -35 位置也有一个相似的保守序列 TTGACA。起始(+1)核苷酸往往是 A 或 G，一般位于一个比较不保守的 CAT 或 CGT 的中心。大多数启动子序列的“共同”序列有一定的差异(图 25-5)。因此，在部分保守的区域发生一个核苷酸的突变就能极大地增加或减小启动子的启动效率，这是因为 *E.coli* 基因的转录速度直接决定于它们的启动子与全酶形成稳定的起始复合物的速度。

起始要求形成一个开放的复合物

818

用一种被称为“**足迹**”(footprinting)技术已经鉴定了 RNA 聚合酶全酶与启动子的结合区域。在足迹法中，将 DNA 和要与之结合的蛋白质温育，然后用烷基化试剂如硫酸二甲酯(DMS)处理，DNA 碱基的烷基化将导致 DNA 链在烷基化部位断裂，然而与蛋白质结合的 DNA 部位不发生烷基化，因而也不会断裂，这种保护作用形成的图式被称为蛋白质的“足迹”。

RNA 聚合酶全酶的“足迹”表明，它主要在 -10 区域和 -35 区域与启动子相结合。在某些基因中，别的上游序列也可以影响 RNA 聚合酶与 DNA 的结合。

DMS烷基化发生在双链或单链DNA上G残基的N7和A残基的N3,DMS也烷基化A的N1和C的N3,但只限于这些位置不参与碱基对的形成。因此DMS烷基化的图式还可揭示DNA是单链还是双链。"足迹"实验研究表明全酶与DNA的"溶解区"(双链分离区)的11个碱基对结合(从-9到+2),所形成的**开放复合物**(open complex)与复制起始点解链DNA区域十分相似(节24-2B)。

核心酶不会特异地与启动子结合,但紧密地与双链DNA结合(复合物的解离常数 $K \approx 5 \times 10^{-12} mol \cdot L^{-1}$,其半衰期为约60min),与此相反,全酶与非启动子DNA的结合则比较松($K \approx 10^{-7} mol \cdot L^{-1}$,半衰期>1s)。有证据表明,σ亚基使全酶沿DNA链迅速移动,以便找到与σ亚基相对应的启动子。转录一旦起始,σ因子立刻离去,核心酶与DNA的紧密结合明显地稳定了酶-DNA-RNA复合物。

不同的σ因子控制基因的表达

因为不同的σ因子识别不同的启动子,一个细胞的σ因子的匹配决定着哪些基因被转录。发育和分化包含着一系列基因有序的瞬时的表达,因此它们的发生和发展就是由不同σ因子联级反应编成的交响乐。例如,**噬菌体SPO1**感染枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)时,要求在不同时间有不同噬菌体基因的表达。第一组表达的基因称为**早基因**(early gene),它的表达使用细菌的σ因子。噬菌体早基因产物之一是称为 $\boldsymbol{\sigma^{gp28}}$ 的σ亚基,它取代宿主的σ因子,从而使RNA聚合酶只能识别噬菌体**中期基因**(middle gene)的启动子,而噬菌体的中期基因,被称为 $\boldsymbol{\sigma^{gp33/34}}$,它只启动噬菌体**后期基因**(late gene)的转录。

细菌细胞中的不同σ因子并不一定以某一顺序发生作用。例如,*E. coli* 的一些σ因子不同于其初始σ因子(这种σ因子被称为 $\boldsymbol{\sigma^{70}}$,因为其分子质量为70kDa),它们控制多组协调表达、用途特殊基因的转录,这些基因的启动子与被 σ^{70} 识别的启动子差别很大。

C. 链的延长

因为RNA的合成与DNA合成一样,以5′→3′方向进行(图25-6),因此延长的RNA分子有5′-三磷酸基团。我们见到的成熟的RNA分子,可能在其一端或两端进行了化学修饰。

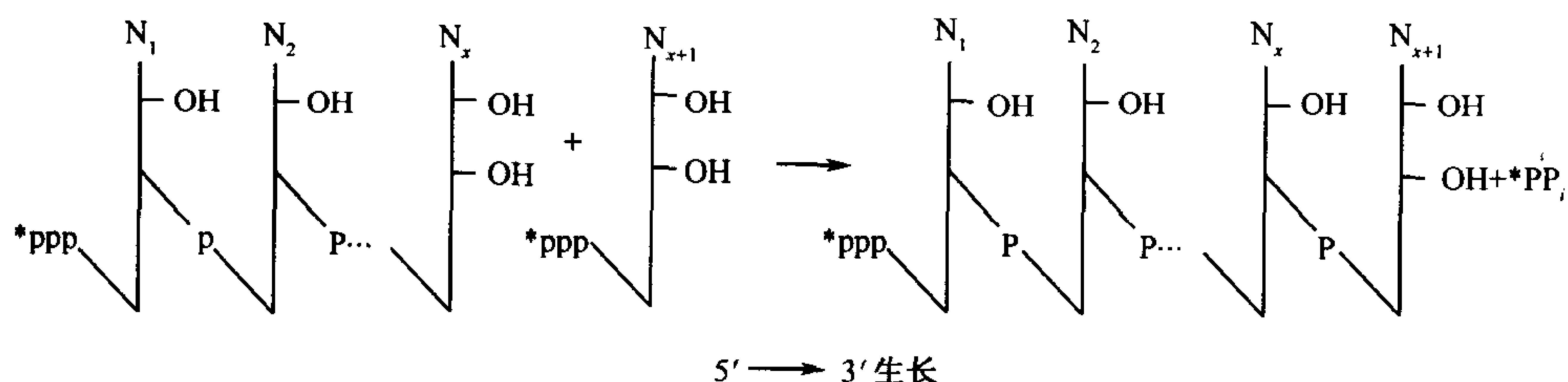


图25-6 5′→3′RNA链的生长

核苷酸被加到生长RNA链的3′端,它是通过下一个三磷酸核苷酸与链的3′-OH结合来实现的。用γ位置放射性标记的NTP(以星号表示)实验证明,RNA链的起始核苷酸(5′端)仍保留着γ位置的同位素标记,而在以后核苷酸相继聚合过程中,这个标记的同位素失落在 PP_i 中。

在RNA合成的部位,双链DNA模板保持打开的状态,这样使反义链能转录成它的互补

RNA链,这个RNA链暂时地形成一段短的RNA-DNA杂交双链。在开放的起始复合物上的不配对DNA"泡",与RNA聚合酶一起沿着DNA向前明显地移动(图25-7)。

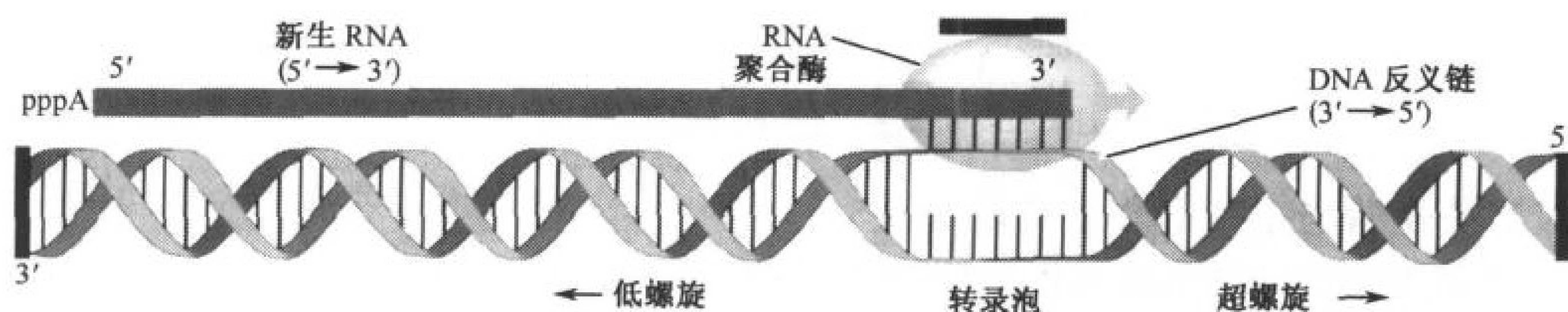


图25-7 转录过程中的DNA超螺旋

在转录区DNA双螺旋解旋一圈,使得DNA反义链能形成一段短的DNA-RNA杂交双螺旋。随着RNA聚合酶沿DNA核板向前移动(这里向右移动),生长RNA 3'端前头的DNA解旋,在其后头则重新形成螺旋,这样,使新合成的RNA从其模板链上脱下。由于DNA的末端和与之结合的RNA聚合酶与细胞相连接(黑色线条),因而阻止了它们的旋转,因此随着转录泡向前移动,其前头的DNA链变得过度超螺旋,而其后头则解旋(试想将你的手指放至此模型两条螺旋的DNA链中间并向右移动的情景)。[引自Futcher, B., Trends Genet. 4, 272(1988)]

随着转录"泡"不断地前移,它前头的DNA双螺旋被挤迫而拧得更紧(更正超螺旋),而在"泡"后头的DNA链则均一地解旋(更负超螺旋)。这种情景在观察*E. coli*质粒的转录中得以证实:由于解旋酶的突变,质粒的转录导致正超螺旋的形成,因为突变的解旋酶不能使正超螺旋松开(节23-1C)。同样,拓扑异构酶I的突变导致负超螺旋的产生,因为突变的拓扑异构酶I不能松开负超螺旋。

RNA聚合酶是连续加工的

当开放复合物一旦形成,转录将连续地进行,而不发生酶与模板解离。连续性的完成虽然没有明显的钳制结构来保证(如*E. coli* DNA聚合酶III的β-钳;图24-14),然而RNA聚合酶拇指紧握着DNA模板以减少酶从模板上解离的可能性。连续性还可能由于在转录泡的前后位点

820

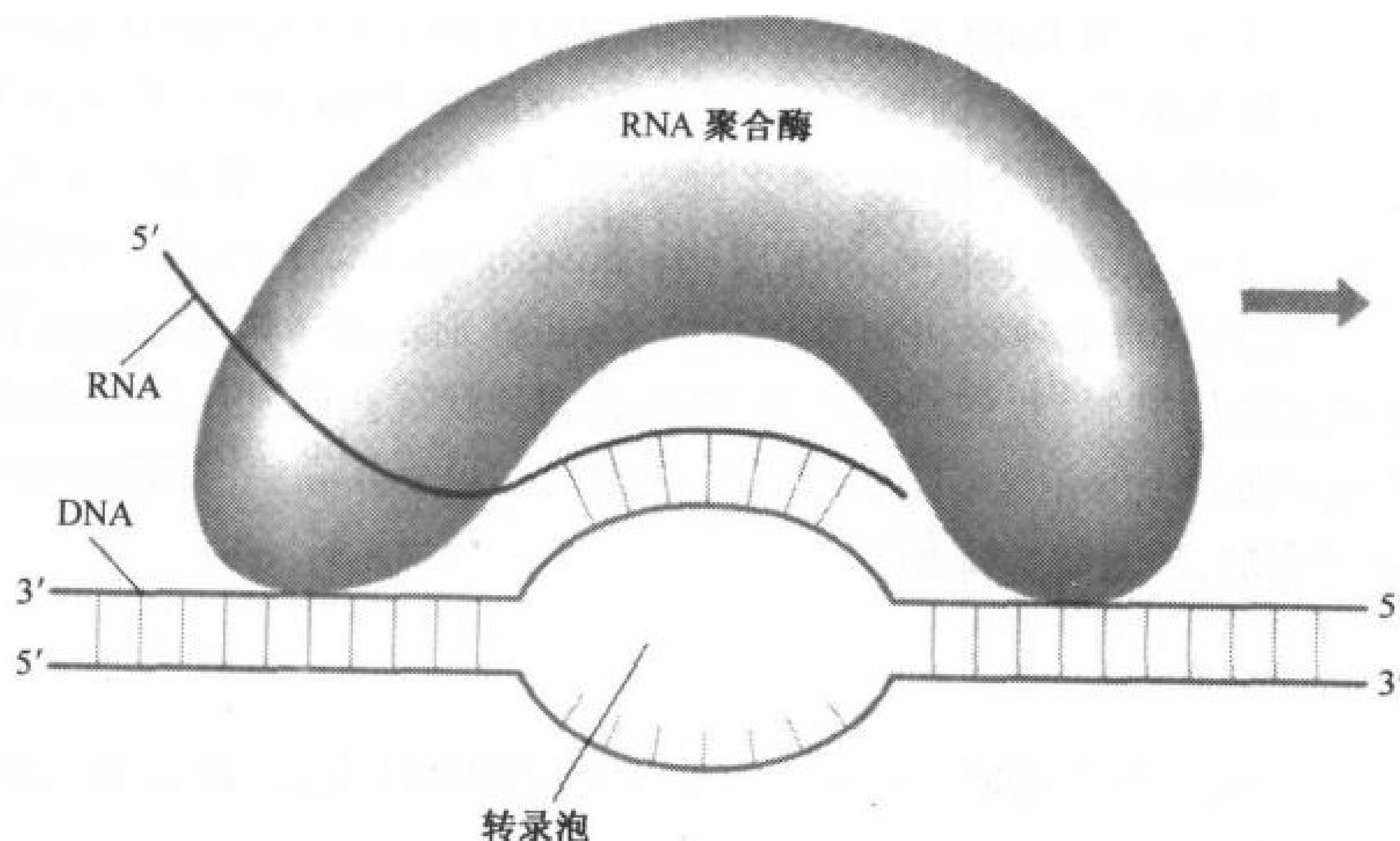


图25-8 一种解释RNA酶连续作业的模型

酶在转录泡的两端抓住DNA。

RNA 聚合酶与 DNA 的结合有高亲和性，却只有低特异性(图 25-8)。多点接触可以解释为什么转录复合物不会与 DNA 模板完全解离，甚至在同一条链上进行 DNA 复制时，RNA 转录也不会被干扰(见框 25-1)。

框 25-1 生物化学焦点

DNA 聚合酶与 RNA 聚合酶的相撞

在快速增殖的细菌细胞中，即使在基因转录的过程中，DNA 的合成也在进行。DNA 复制的机器沿着环状的染色体移动，其速度比转录机器运动快许多倍，因此 DNA 聚合酶与 RNA 聚合酶的碰撞不可避免。两个酶相撞时会发生什么情景呢？使用体外模型系统，Bruce Alberts 已指出，当两个酶以同一方向移动时，复制叉超过 RNA 聚合酶而无须将该酶顶出，并让它能继续完成 RNA 键的延长。

但是当复制叉与转录复合物顶头相撞时，复制叉在超过 RNA 聚合酶之前先作短暂停顿，奇妙的是，这一停顿使 RNA 聚合酶能改变其模板链。伸长的 RNA 链从其原有的模板 DNA 链上解离，并与新合成的子链 DNA 的相同序列杂交，并继续伸长。

顶头相撞有许多缺点，因为①当 DNA 聚合酶停下来时，复制将放慢；②当 RNA 聚合酶从一个模板跳到另一条模板时要进行解离，这有可能导致转录过程的流产。事实上，在许多细菌和噬菌体的基因组中，大部分大量转录的基因的排列方向是使复制叉和转录复合物的酶处于同一方向。至于真核生物的基因组，它们含有更多复制点，而且基因也比原核大。它们是否有类似的时间安排，目前还不清楚。

转录速度快

体内转录的速度是 37℃ 每秒 20～50 个核苷酸(但仍然比 DNA 复制慢几倍，节 24-2)。RNA 合成错误率为每 10^4 个转录的核苷酸有一个错误。这种错误频率约是 DNA 合成的 $10^4 \sim 10^6$ 倍，但是是可以耐受的，因为大多数基因是重复转录，而且遗传密码含有许多同义字(见节 26-1C)，还有，蛋白质中氨基酸的置换往往不影响功能。

821

一旦 RNA 聚合酶分子已经起动复制并从启动子部位离开，另一个 RNA 聚合酶紧接着与该启动子结合。当需要某种 RNA 大量合成时，如 rRNA，它的起动几乎无间隙，大约每秒起动一次，结果被转录的 DNA 成了箭头状(图 25-9)。编码蛋白质的 mRNA 的合成频率要小得多，而且不同多肽生成的量有极大的差别。例如，一个 *E. coli* 细胞含有10 000个拷贝的核糖体蛋白，而调控蛋白则可能一个细胞只有几个拷贝。许多酶，特别是那些参与维持细胞基本功能的酶，以相对比较稳定的速度被合成。这些酶被称为**组成酶**(constitutive enzyme)，另一些酶被称为**诱导酶**(inducible enzyme)，它们的合成速度决定于细胞的情况，差别很大。基因表达的调控在很大程度上依赖于控制转录速度的机制，我们将会在节 27-2 看到其状况。转录产物的稳定性也是很不同的，核糖体 RNA 的转换率比 mRNA 要慢，原核生物的 mRNA 合成快，降解也快(有时快到一个 mRNA 的 3′端还未合成，5′端就被降解)。

D. 链的终止

图 25-9 的电子显微镜照片说明，DNA 含有终止转录的特殊位点，许多 *E. coli* 基因的转录终止序列有两个共同的特点(图 25-10a)。

1)有一组连续的 4～10 个 A·T 碱基对，A 存在于模板链上，RNA 的转录在这个位点或刚刚过这个位点就终止。

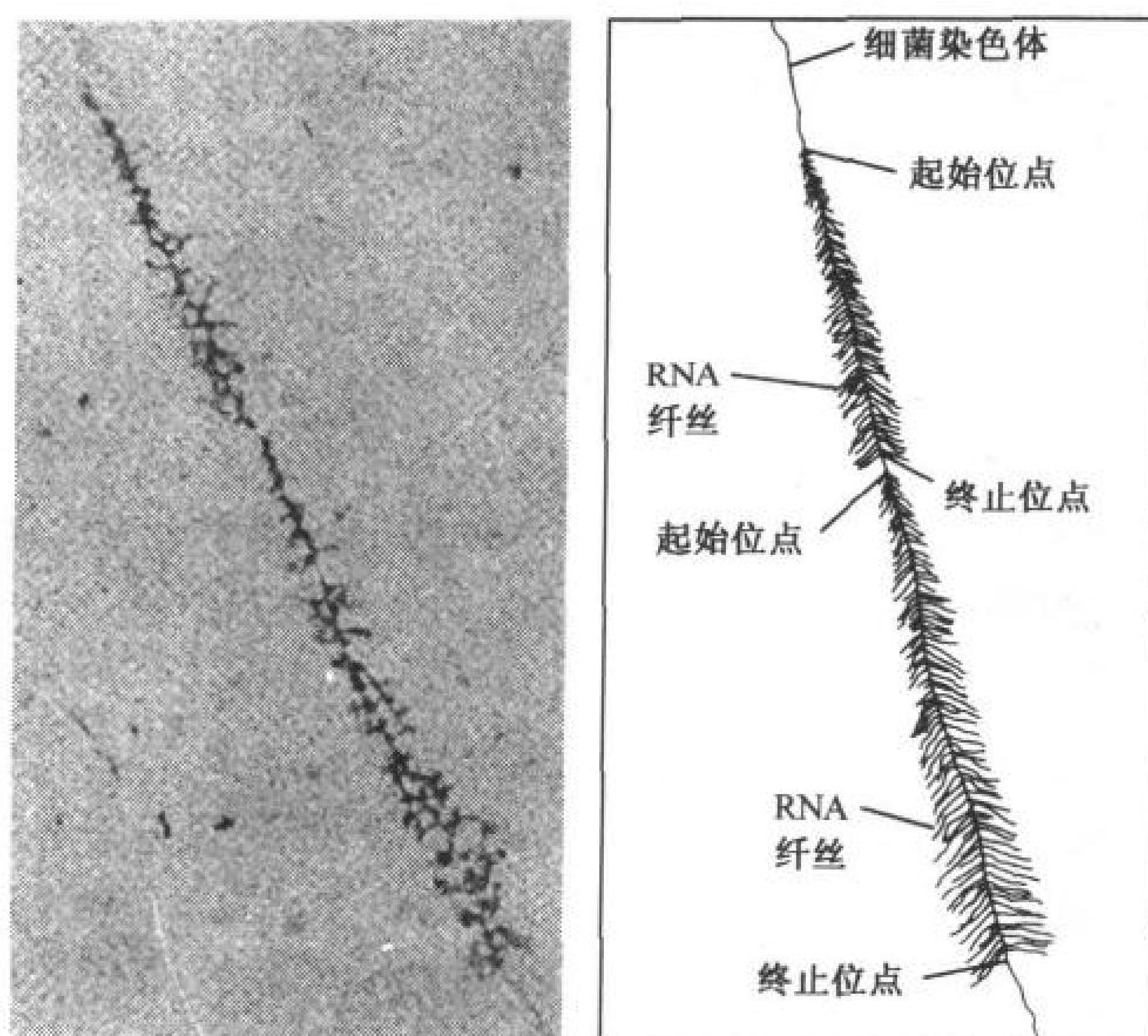


图 25-9　两个相邻的 *E. coli* 核糖体基因转录的电镜照片和手绘图

当 RNA 聚合酶分子沿 DNA 链从转录起始位点移到终止位点时，新生 RNA 链的延长形成“箭头状”结构。

（引自 Virginia 大学的 Oscar L. Miller, Jr. and Barbara A. Hamkalo）

2)在一组 A·T 碱基对之前，有一富含 G+C 的区域，它的序列是回文结构，这一区域的 RNA 转录物能自我形成“发卡”结构，紧接着以许多 U 残基结束(图 25-10b)。

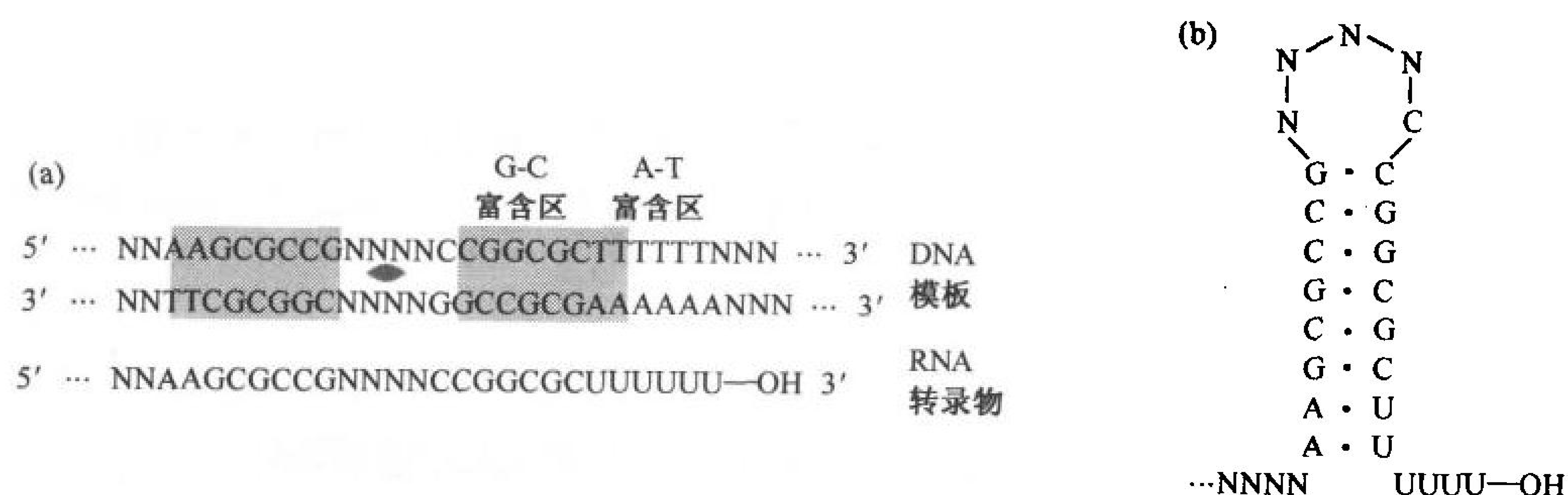


图 25-10　大肠杆菌强终止子模型

碱基序列是从一些转录物序列推导出来的。(a)DNA 序列及其相应的 RNA。A·T 富含区和 G·C 富含区分别以蓝色和红色表示，双重对称轴(绿色符号)与两侧阴影部分的片段相关连，阴影部分的片段形成反向重复。(b)RNA 发卡结构和聚 U 尾巴，它们引起转录的终止。[引自 Pribnow, D., in Gocdberger. R. F. (Ed.), Biological Regulation and Denelopment, Vol., P. 253, plenum Press (1979)]

一个 RNA 转录物在其终止子的富含 GC 发卡上的结构稳定性及其寡聚 U 尾巴与模板 DNA 的弱碱基配对是保证链准确终止的两个重要因素。GC 富含区形成的发卡结构导致 RNA 聚合酶在数秒钟内停在终止位点。这可能诱导 RNA 聚合酶构象的改变，从而使非模板 DNA 链从模板链上取代弱结合的寡聚 U 尾巴，终止转录。

822

除了前面所述，Michael Chamkerlin 的实验表明，RNA 终止子的发卡结构和富含 U 的 3′尾巴不是孤立的作用，还与其上游和下游的一些区域相关。事实上，一些缺少 U 富含区的终止子，当它与紧连终止子下游的合适序列连接在一起时，能发生高效的终止。终止效率还决定于核苷三磷酸的浓度、盐浓度和终止子的序列。*这些结果说明终止是一个复杂的多步骤的过程*。

终止往往还需要 rho 因子

前面描述的终止序列能诱导转录的自发终止。另外一些终止位点，它们没有任何明显的相似性，而且不能形成强的发卡结构，*它们需要一种称之为* **rho 因子**的*蛋白质来终止转录*。rho 因子是一个含 419 个氨基酸残基的相同亚基的六聚体，它能增强自发终止转录物的终止效率，并能导致非自发终止转录物的终止。

从一些关键的观察得到了依赖 rho 因子的终止作用模型：

1)rho 因子是一种酶，它能催化 RNA-DNA 和 RNA-RNA 双螺旋的解旋，这一过程的能量来自核苷三磷酸水解成核苷二磷酸和 P_i，而与碱基的性质关系不大。

2)遗传操作研究表明，rho 因子依赖性终止要求有一个特殊的识别序列，它存在于新生 RNA(还在合成中的)终止点的上游。

这些观察表明，rho 因子在其识别序列与 RNA 连接，然后沿 RNA 的 5′→3′方向移动，直至遇到停留在终止点的 RNA 聚合酶(如果没有聚合酶的停留，rho 因子不可能赶上 RNA 聚合酶)。在那儿 rho 因子使转录泡上的 RNA-DNA 双螺旋解旋，因而释放出 RNA 转录物。由 rho 因子终止的转录物通常含有约 50 个核苷酸左右的 3′末端。这说明 rho 因子逐渐地将 RNA 从其 DNA 模板上移开，而不是在某一特定的位点将其释放。

2. 真核生物的转录

虽然原核生物和真核生物转录的基本原则是相似的，但*真核生物的转录有其特点，即它有多种 RNA 聚合酶，并有较复杂的调控序列*。真核生物的转录机器也更加复杂，需要多达 50 种蛋白质来识别调控序列和起始转录。

A. 真核 RNA 聚合酶

823

真核细胞核中含有 3 类不同的 RNA 聚合物，它们合成的 RNA 是不同的：

1)**RNA 聚合酶 I**，它存在于**核仁**(nucleoli)中(染深色的核体，核糖体在那里组装；图 1-8 和 26-3 节)，它合成大多数 rRNA 的前体；

2)**RNA 聚合酶 II**，它存在于核质中，合成 mRNA 的前体；

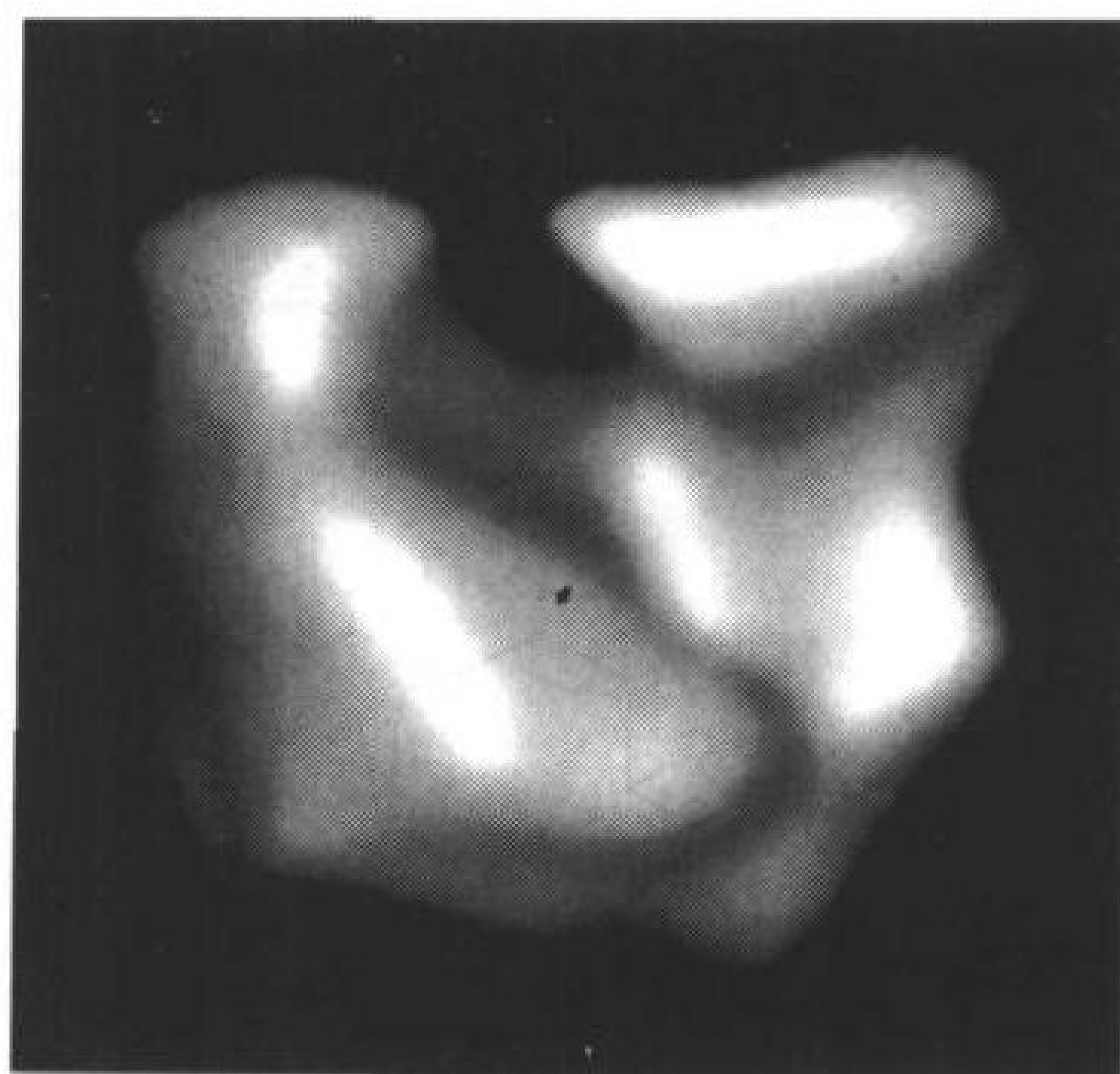
3)**RNA 聚合酶 III**，它也存在于核质中，合成 5S rRNA、tRNA 和其他的核和胞质小 RNA 的前体。

除了这些核酶以外，真核细胞还含有独立的线粒体和叶绿体 RNA 聚合酶。由于 RNA 聚合酶在所有细胞中的不可缺少的功能，它们已成为抗生素和其他药物的最具吸引力的靶(见框 25-2)。

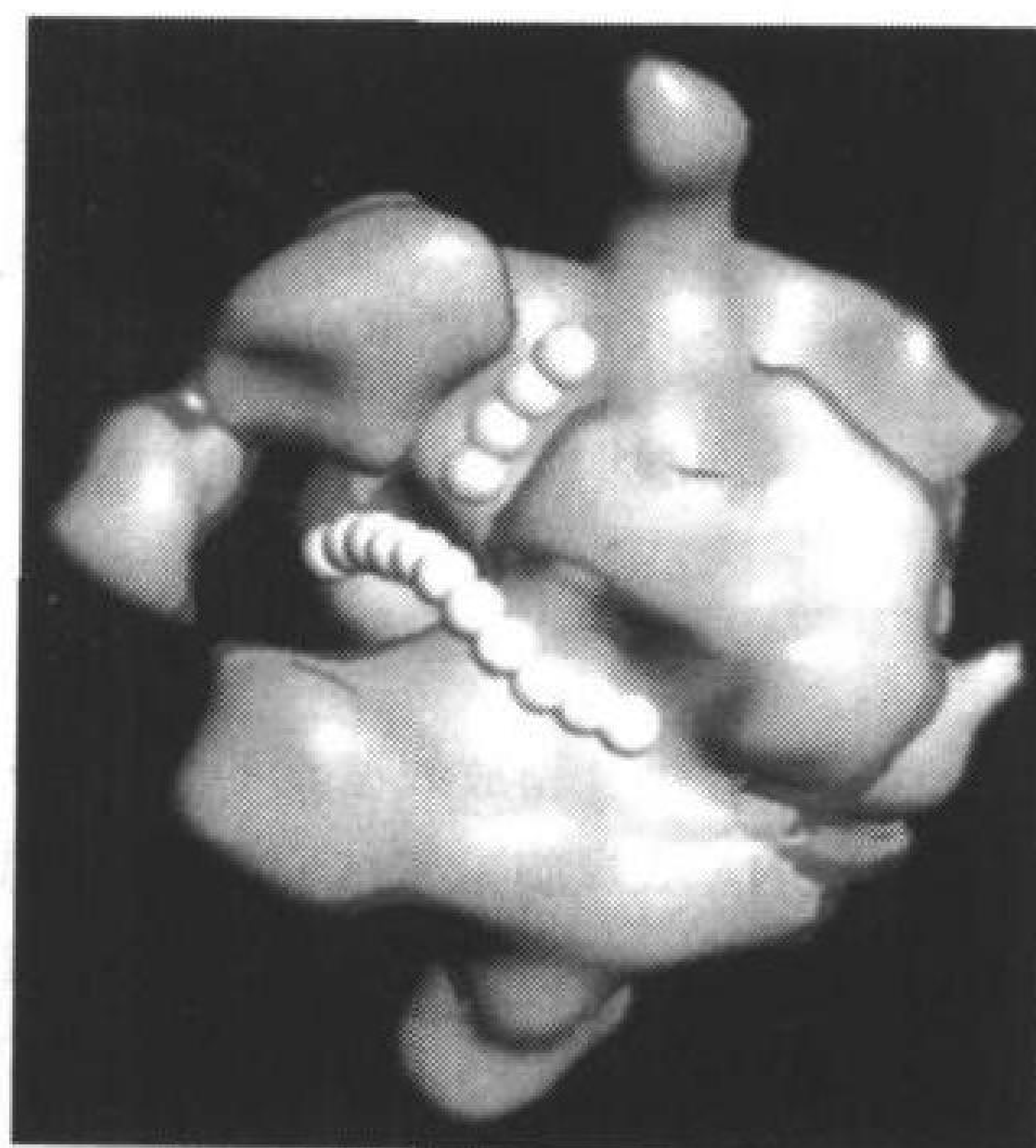
真核 RNA 聚合酶的分子质量在 500～700kDa 之间，它们的特征是亚基组成的 Byzantine 复杂性，每一种酶含有两个不同的“大”亚基(>100kDa)和一列多至 12 个“小”亚基(<50kDa)，例如酵母 RNA 聚合酶 II，它的分子质量为 550kDa，含有 12 个亚基，3 个大亚基是原核 RNA 聚合

酶 α、β、β′亚基的类似物，它们组成该酶的结构和功能核心。

酵母RNA聚合酶I和II的低分辨率结构已用电子结晶学方法加以测定(图25-11)。这两个蛋白质是不规则形的，二者很相似，而且也与*E. coli* RNA聚合酶(图25-2a)相似。它们最显著的特征是一个拇指圈起25Å宽的沟槽，沟槽在该蛋白质的表面。看来这是与B-DNA结合的部位。在RNA聚合酶II结构中(图25-11b)，有一个沟槽，它的宽度足够容纳一条RNA链，它是从邻近的DNA结合槽分支出来的，这两条槽接近垂直。



(a)



(b)

图25-11 电子结晶学方法测定的真核RNA聚合酶的结构

(a)酵母RNA聚合酶I，30Å分辨率，不规则形状的蛋白质，其大小约150Å×110Å×100Å，一个30Å宽和100Å长的沟从上中部伸向右下方，这是推测的DNA结合位点。(引自 Patrick Schultz 和 Pierie oudet Laboratoire de Genotigue Moleaulaire des Eucaryotes, strasbouig Franoe)(b)酵母RNA聚合酶II，16Å分辨率，此酶的大小是140Å×136Å×110Å，珠的直径为8Å，每6.8Å一个珠，粉红色珠链标示设想的DNA结合槽(其宽度为25Å)，亮绿色珠链标示RNA结合槽(其宽度为12～15Å)，它从DNA结合槽分支出来。(引自 of Roger Kornberg, Standford University)

824

B. 真核启动子

真核启动子比原核启动子更复杂和更多样性。有意思的是，起始真核基因转录所需要的许多因子与其相应的转录顺序，有着不同的位置和取向。

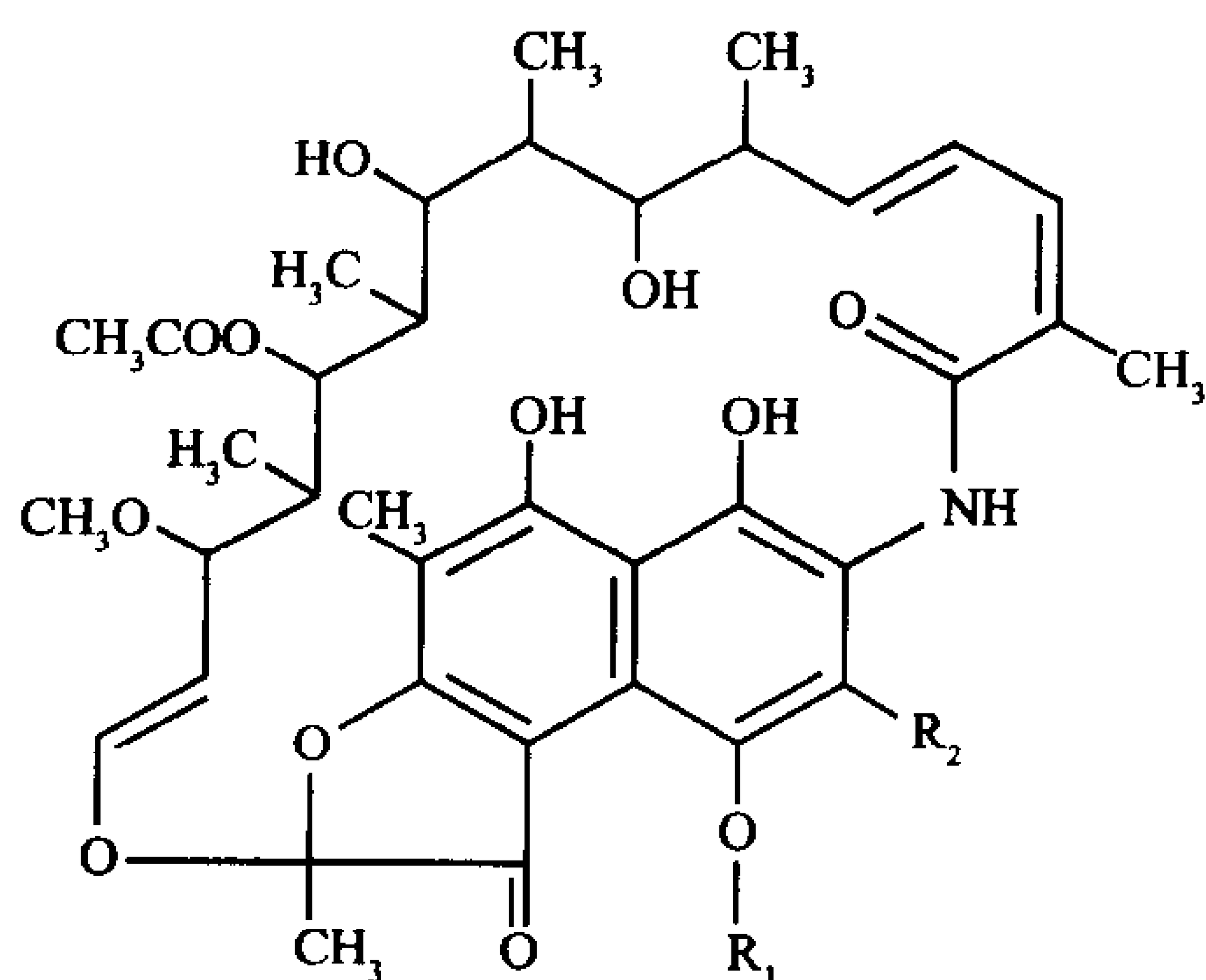
RNA聚合酶I启动子

不论原核还是真核基因组，含有多个rRNA基因拷贝，以满足合成大量rRNA的需要(rRNA约占*E. coli*细胞RNA的80%)。因为某一真核细胞中的大量rRNA的基因具有基本相同的序列，因此RNA聚合酶I只识别一种启动子。与RNA聚合酶II和聚合酶III的启动子不同，RNA聚合酶I的启动子是种特异的，即RNA聚合酶I只识别它自己的启动子和与之极亲近种的启动子。

为了鉴别RNA聚合酶I的启动子，人们从接近其转录位点的上游和下游进行缺失处理，观察不断增长的缺失对一个rRNA基因转录速度的影响。这类研究已发现，例如，哺乳动物的RNA聚合酶I要求一个**核心启动子成分**(core promoter element)，其位置横跨−31到+6，因而与转录区域重叠。但是高效转录还要求**上游启动子成分**(upstream promoter element)，它位于−187和−107残基之间。

框 25.2 健康与疾病的生物化学

转录抑制剂



利福霉素 B　R_1=CH_2COO^- ;R_2=H

利福平　R_1=H; R_2=CH═N⁺(哌嗪)N—CH_3

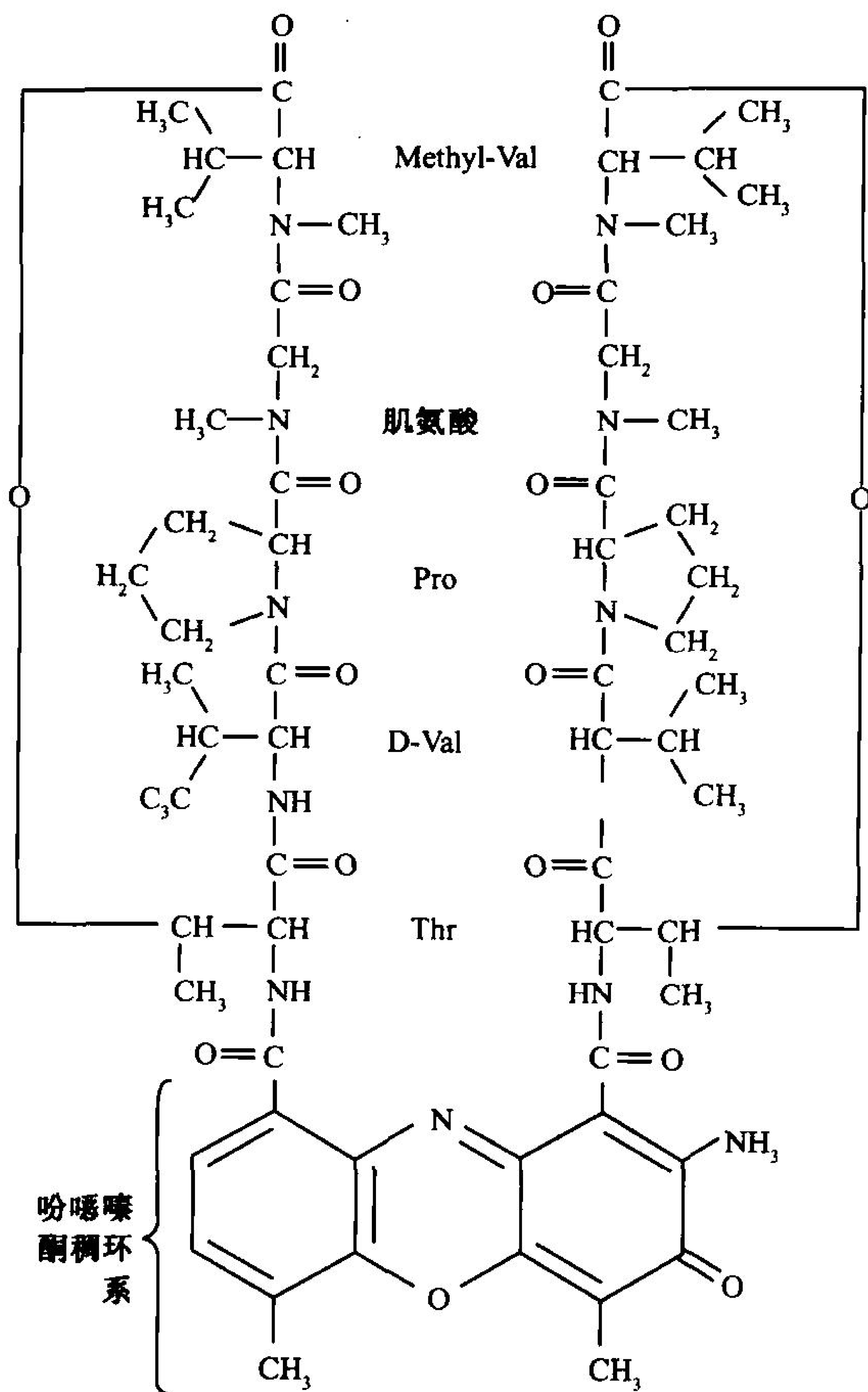
有多种多样的化合物能抑制原核生物和真核生物的转录。因此这些因子对敏感生物体是有毒的。它们有些以抗生素发生作用,这类化合物也能用作研究的工具,因为它们能在特定的位点阻止转录过程。

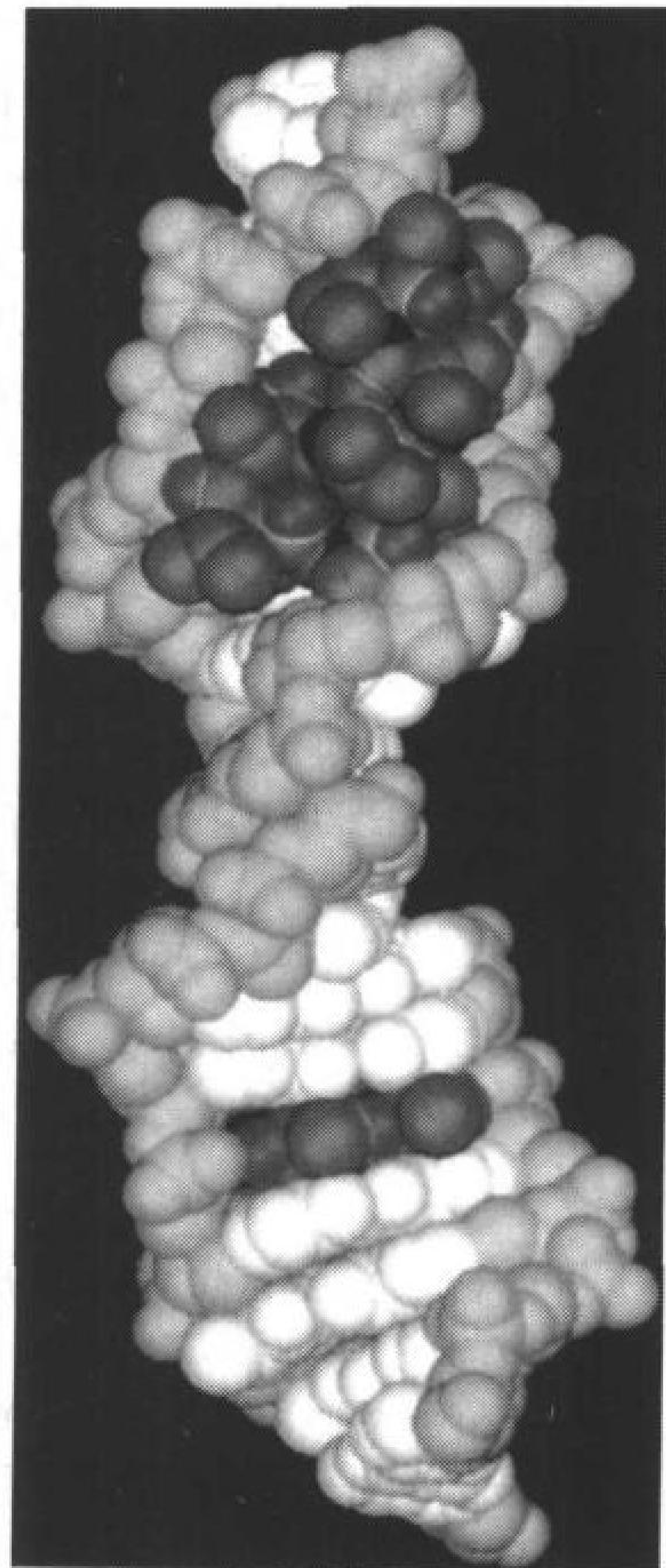
两个相关的抗生素,**利福霉素** B(rifamycin B),它由 *Streptomyces mediterranei* 产生,和半合成衍生物**利福平**(rifampicin),它们特异地抑制原核 RNA 聚合酶,但不抑制真核 RNA 聚合酶。利福平作用的选择性和高效性(2×10^{-8}mol/L 能 50%抑制细菌 RNA 聚合酶)使其成为药用杀菌剂。利福霉素既不抑制 RNA 聚合酶与启动子的结合,也不抑制第一个磷酸二酯键的形成,但它阻止链的伸长。失活的 RNA 聚合酶仍然与启动子结合,从而阻断了没有被抑制酶的转录起始。一旦 RNA 链起始反应,利福霉素就不能影响链的伸长过程。因此利福霉素在实验室中被用来切断转录起始和伸长。

一种细菌的化合物放线菌素 D,这是一种有用的抗肿瘤(抗癌)剂,它由 *Streptomyces antibioticus* 产生,它能与 DNA 双螺旋紧密结合,从而极强地抑制转录和 DNA 复制,它可能是通过干扰 RNA 聚合酶和 DNA 聚合酶的通过。下页的图是放线菌素 D 与 DNA 8 个碱基对形成的复合物的 X 射线结构图,两个垂直重叠复合物以空间填充模型表示,DNA 的糖-骨架为黄色,碱基为白色,放线菌素的颜色由原子种类决定(C 绿色,N 蓝色和 O 红色)。

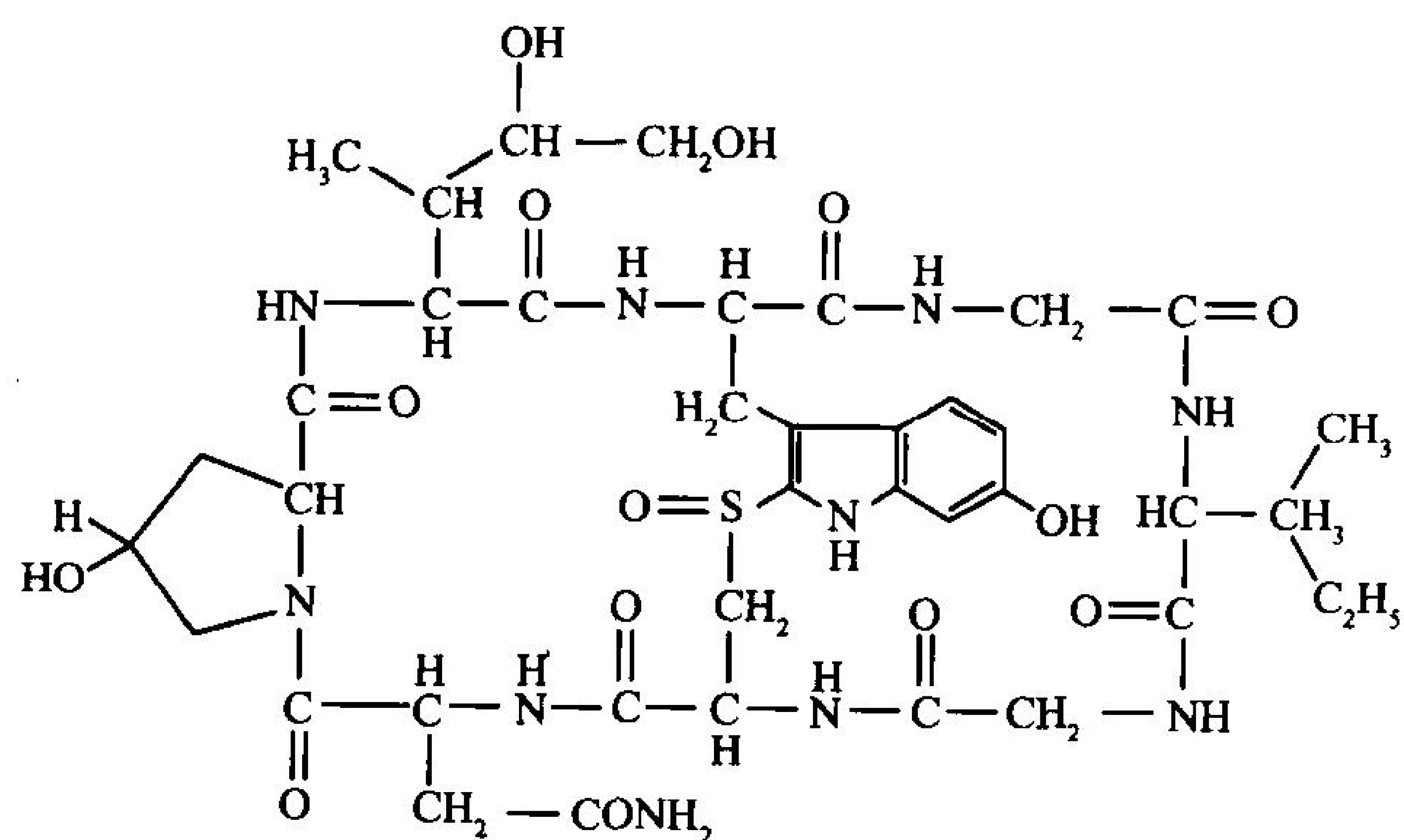
放线菌素的吩噁嗪酮稠环(phenoxazone)系(它在分子结构图的下部显示)插入 DNA 的碱基对之间,致使 DNA 双螺旋解旋 23°,并使相邻碱基对分开 7.0Å。放线菌素的化学上相同的环状 depsipeptide (它在分子的上部显示,depsipeptide 既有肽键,又有酯键)沿 DNA 小沟从链间嵌合部位向相反方向延伸。其他链间嵌合剂,包括溴乙锭和原黄素(proflavin 见节 23-3B),也可能通过相似的机制抑制核酸的合成。毒蘑菇 *Amanita phalloides*(残帽),它是导致欧洲大部分蘑菇致死的祸首,它含有多种有毒物质,包括一系列不常见的双环八肽,称之为**鹅膏毒素**(amatoxin)。**α-鹅膏蕈碱**(α-amanitin)是鹅膏毒素的代表,它与 RNA 聚合酶 II 形成紧密的 1:1 的复合物($K=10^{-8}$mol·L^{-1}),能与 RNA 聚合酶 III 形成松散一些的复合物($K=10^{-6}$mol·L^{-1}),因此它能特异地阻断转录的伸长步骤。RNA 聚酶 I、线粒体、叶绿体和原核 RNA 聚合酶对 α-鹅膏蕈碱不敏感。

尽管鹅膏毒素的毒性强(约 40g 鲜蘑菇中,含有的 5~6mg 毒素,足以杀死一个成年人),但它们的作用缓慢,一般由于肝脏功能的破坏而致死,死亡发生在吃毒蘑几天后(和从别的蘑菇毒素的影响中恢复之后)。这部分地反应了真核 mRNA 和蛋白质的低转换率。





放线菌素 D



α-鹅膏蕈碱

RNA 聚合酶 II 调控序列

RNA 聚合酶 II 识别的启动子有显著的多样性。在所有组织中表达的结构基因(看家基因,它们被组成型地转录)有一个或多个 GGGCGG 序列的拷贝,或它的互补序列(**GC 框**),这些序列

826　位于转录起始位点的上游。缺失或点突变的分析表明，GC 框的功能与原核生物的启动子相似。另一方面，那些在一种或数种细胞中选择性表达的结构基因往往没有这种富含 GC 的序列，代替它的是一种保守的 AT 富集的序列，它位于转录起始位点上游 25 到 30 核苷酸处(图 25-12)。注意，这个所谓的 **TATA 框**类似于原核启动子(TATAAT)的 – 10 区域，虽然相对于起始位点的位置有些不同(– 27 而不是 – 10)。然而这两种启动子成分的功能不是十分相似的，因为 TATA 框的缺失并不一定都消除转录，相反，TATA 框的缺失或突变会导致转录起始位点的多样性，因此 TATA 框的功能是参与起始位点的选择。

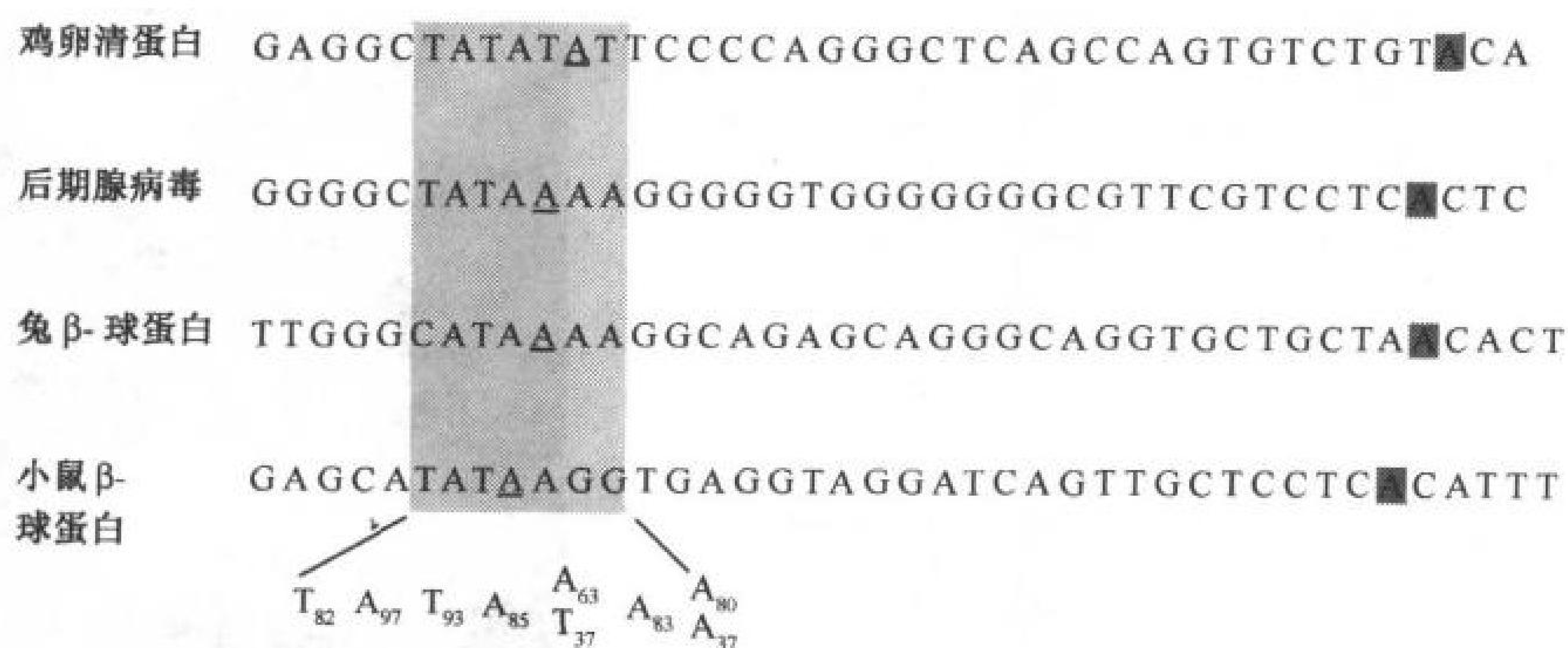


图 25-12　选择的一些真核结构基因的启动子序列

同源片段、TATA 框加上红色阴影，下横线表明是 – 27 位，转录的起始核苷酸(+ 1)是绿色阴影，底部一行指出一些启动子的共同序列，数字代表相应碱基发生的百分率。[引自 Gamon, F., O'Hare, K., Perrin, F., Le Pennec, J. P., Benoist. C., Cochet, M., Breathnach, R., Royal, A., Garapin, A., Cami, B., Chambon, P., Nature 278, 433(1978)]

在基因的 – 50 和 – 110 之间，还有一些启动子成分。例如，许多真核结构基因有一个共同的保守序列 CCAAT(称 **CCAAT 框**)，它大约位于 – 70 和 – 90 之间，它的改变极大地影响基因的转录速度。有证据表明，在 TATA 框上游的启动子序列是 RNA 聚合酶 II 的 DNA 结合位点，而且还有其他蛋白质参与转录的起始。

另外，距离转录序列上百或上千个碱基的一些序列可能起基因转录**增强子**(enhancer)或**沉默子**(silencer)的作用。这些区域可能改变 DNA 局部构象，从而促进或干扰 RNA 聚合酶 II 的结合。例如，有些增强子含有一段嘌呤和嘧啶相间序列，就像 Z-DNA 序列形式一样(见节 23-1A)。有些增强子位点缺乏组蛋白，组蛋白通常包裹真核 DNA 并可能阻断 RNA 聚合酶 II 的结合。有一些调控蛋白，如**激活因子**(activator)或**阻遏物**(repressor)，能与增强子或沉默子结合，从而影响 RNA 聚合酶与启动子的结合(某些这类调节转录的机制已在节 27-3B 中作了描述)。有些增强子还有隐密性，它们没有相对于转录序列的固定位置。

RNA 聚合酶 III 启动子

某些由 RNA 聚合酶 III 转录的基因的启动子，完全处于基因的被转录区域之内。从这些基因被转录部分的外端或另一端逐个缺失碱基，如果缺失区延伸到 + 40 和 + 80 之间的核苷酸片段，可能会阻止转录。基因的这一部分起到启动子的作用，因为它包含转录因子的结合位点，这些转录因子激活 RNA 聚合酶 III 在上游的结合。另外一些 RNA 聚合酶 III 转录的基因的启动子，部分或完全在起始位点的上游。

827

C. 转录因子

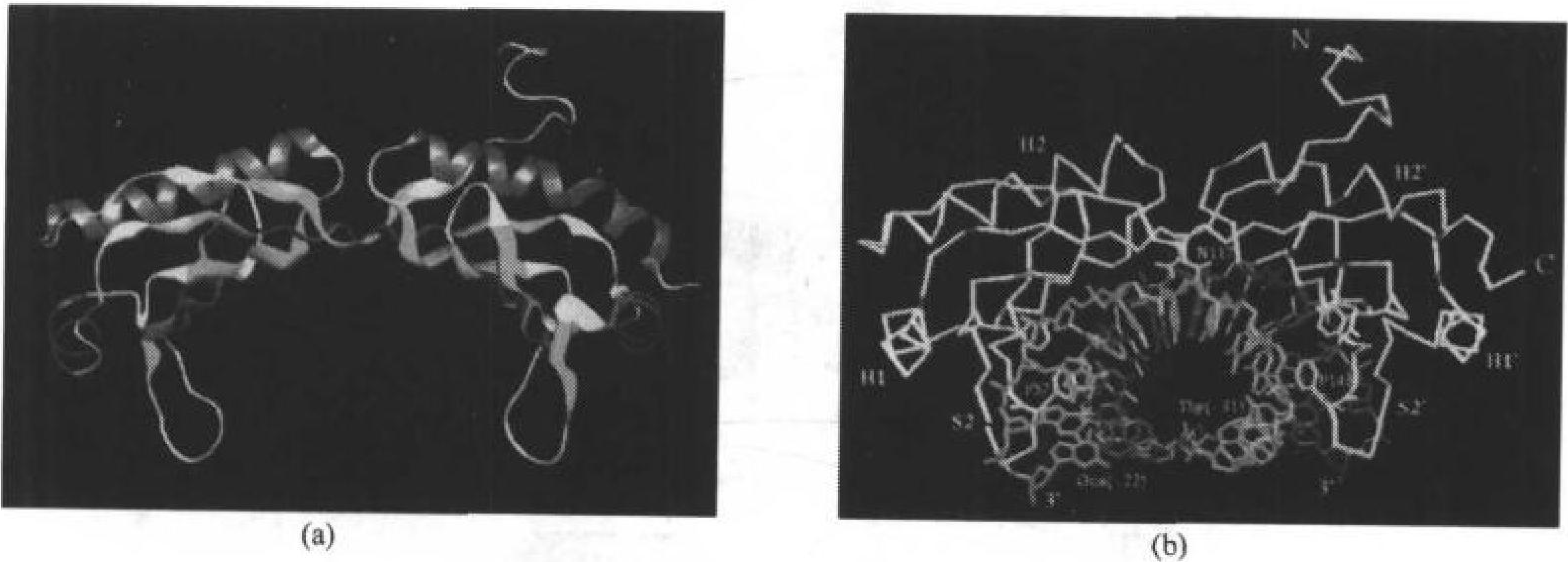
分化的真核细胞的显著特点是具有选择特殊基因表达的能力。在同一有机体的两个细胞中，某一种特殊蛋白质的合成速度可以相差 10^9 倍，例如网织红细胞(未成熟的红血球)合成大量的血红蛋白，但没有可检测量的胰岛素，而胰脏的 β 细胞能产生大量的胰岛素，却没有血红蛋白。相反，原核系统转录速度的差异不会超过千的数量级，因此在任何一个细胞中都含有至少几个它们编码的蛋白质。不过*真核细胞的结构基因转录起始的基本机制与原核的很相似，即蛋白质因子与 DNA 的启动子区域选择性地结合*。在真核系统中至少有 6 个**通用转录因子**(general transcription factor, GTF, 表 25-1)起到相当于原核系统中 σ 因子的作用，某些真核转录因子的结构已在 23-4C 节中作了描述。

828

表 25-1　人的 RNA 聚合酶 II 基础转录需要的转录因子

因子	亚基数	分子质量/kDa
TF II D		
TBP	1	38
TAF	12	15～250
TF II A	3	12, 19, 35
TF II B	1	35
TF II E	2	34, 57
TF II F	2	30, 74
TF II H	9	35～89

引自：Roeder, R. G. Trends Biochem. Sci 21, 329(1996)



(a)　　(b)

图 25-13　植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)TATA 结合蛋白(TBP)的 X 射线衍射结构

(a)一个无 DNA 的 TBP 分子的带状图，红色为 α 螺旋，蓝色为 β 折叠，其余多肽链骨架为白色，蛋白质的假二重对称轴是垂直的。注意似乎蛋白质以十分合适的大小和形状坐跨在直径为 20Å 的无变形的 B-DNA 圆柱上。然而实际并非如此。(b)TBP 与 DNA 的含有 14bp TATA 框的片段形成的复合物，蛋白质以其 C_α 骨架(白色)表示，57、74、148 和 165 位上的苯丙氨酸残基侧链以黄色表示，这些残基引起 DNA 明显的扭曲，27 和 117 位的天冬酰胺(也是黄色)在小沟形成氢键，52 位的异亮氨酸和 163 位的亮氨酸(蓝色)参与对 DNA 的特异识别。DNA 以棍式表示，有意链和反意链分别以绿色和红色表示。B-DNA 以其有意链的 5′端从右侧进入它的结合位点，并从左侧以其双螺轴与纸面成垂直方向出来。在 TATA 两端的扭曲之间，DNA 部分解旋，蛋白质的 8 个 β 折叠片层插入其变宽了的小沟中。(引自 Courtesy of stephen Burley. The Rockefeller University)

从人到酵母中都高度保守的 6 个 GTF 是合成所有 mRNA 都必需的，甚至对那些有强启动子的基因也是如此。这些因子可以引起低(基础)水平的表达，其他一些基因特异转录因子的参与可以增强这种表达。GTF 的命名包括 TF(转录因子)和其后的罗马数字 II，是指参与由 RNA 聚合酶 II 催化的转录。GTF 有序地与酶和启动子 DNA 结合。

当 **TATA 框结合蛋白**(TBP，它是 TFIID 的一个组分)与启动子的 TATA 框结合时，就开始形成**前起始复合物**(preinitiation complex，PIC)，这种多蛋白复合物能起始转录。TBP 的 X 射线衍射结构的测定已由 Roger Kornberg 和 Stephen Burley 独立完成，它是一种鞍座状的分子，由两个以假二重对称排列的结构相似的结构域组成(图 25-13a)。TBP 的总体结构表明，它可能像一件背心，它的双襟紧裹着没有变形的 B-DNA 两螺旋。但是由 Burley 和 Paul Sigler 独立完成的

828

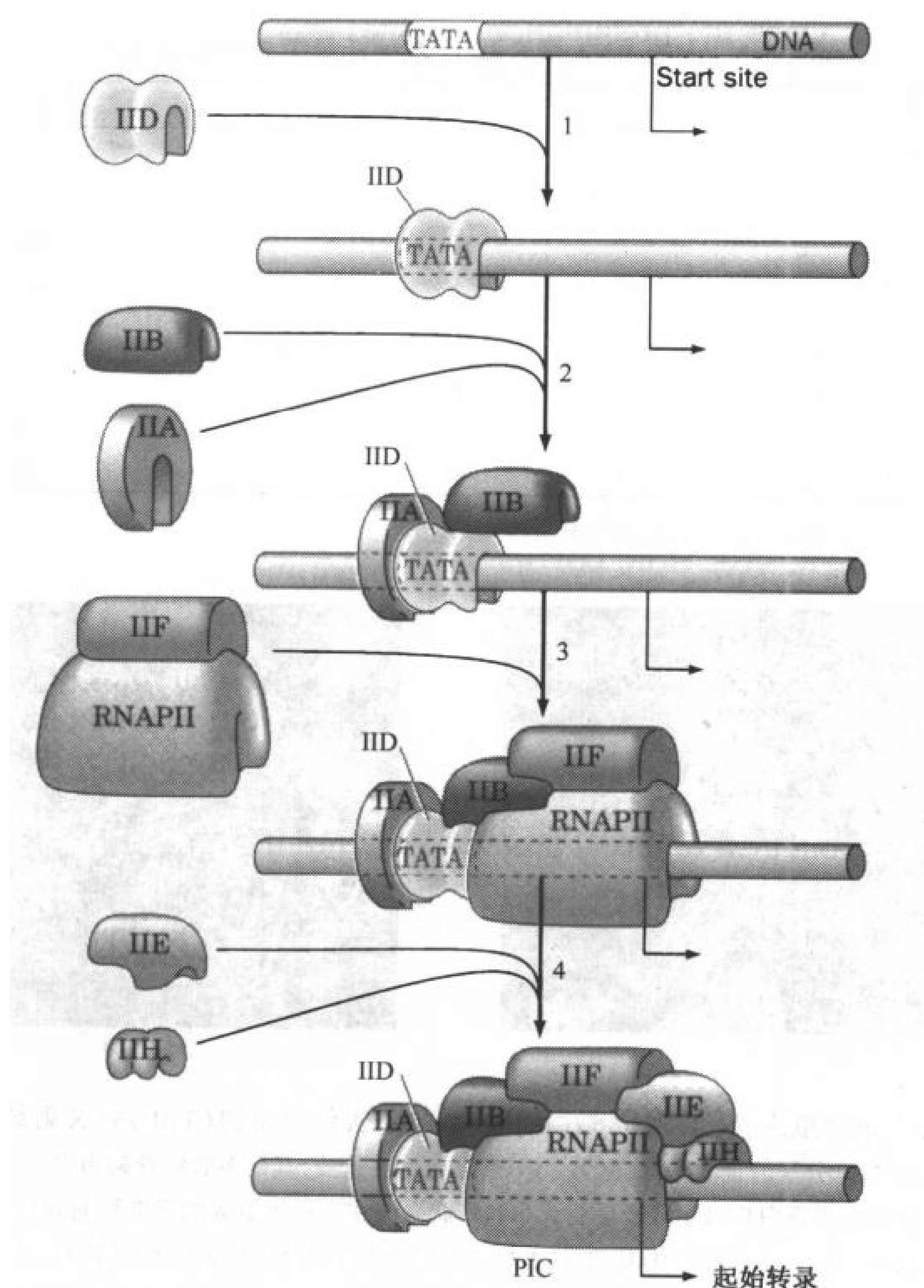


图 25-14 *功能的秘诀*：前起始复合物(PIC)与含 TATA 框启动子的组合

(1)TFIID 的 TBP 成分与 TATA 框结合。(2)然后 TFIIA 和 TFIIB 结合。(3)TFIIF 与 RNA 聚合酶 II 结合并护送它进入复合物。(4)最终 TFIIE 和 TFIIH 相继加入完成 PIC。[引自 Zawel, L. and Reinberg, D., Curr. Opin. Cell Biol. 4, 490(1992)]

TBP-DNA复合物的X射线衍射结构分析表明，它们间的结合方式很不一样。事实上，DNA以双螺旋轴与鞍座的柱状轴以几乎垂直而非平行的方式与TBP表面的凹面结合(图25-13b)。结合的DNA与曲柄状的TBP相互作用产生十分明显的弯曲(扭结)。TBP通过氢键和von der Waals引力与DNA结合，并产生很小的构象的改变。扭曲和部分解旋的DNA由鞍座两侧的两个Phe残基稳定，鞍座结构撬开小沟两侧位于扭曲端的两对碱基。TBP是GTF中仅与DNA特异序列结合并识别转录起始位点的转录因子。DNA变曲的构象造成一个工作面，可以让其他蛋白质插入前起始复合物。

图25-14指出其他参与基础转录的GTF因子。前起始复合物至少要求有TBF、**TFIIB**、**TFIIE**、**TFIIF**和**TFIIH**。**TFIIA**可能稳定TBP-TATA框的结合，因此对于强启动子，它可能是不需要的。TFIID的其他组分(除TBP外)，称为**TBP相关因子**(TBP-associated factor, TAF)，可能是激活因子，能增加转录的速度，对于前起始复合物，它不是严格需要的。*蛋白质结合的顺序对GTF成员和RNA聚合酶是十分严格的*，例如，TFIID的TBP成分、TFIIB和TFIIA，必须在RNA聚合酶II结合后再与DNA结合。

TBP-TFIIA-TFIIB-DNA复合物的X射线衍射结构模型(图25-15)揭示，即使有3个蛋白质与转录起始位点上游结合，仍有很大的空间，可容纳另外的蛋白质-DNA和蛋白质-蛋白质结合，以调控RNA聚合酶II与基因启动子结合的频率。 829

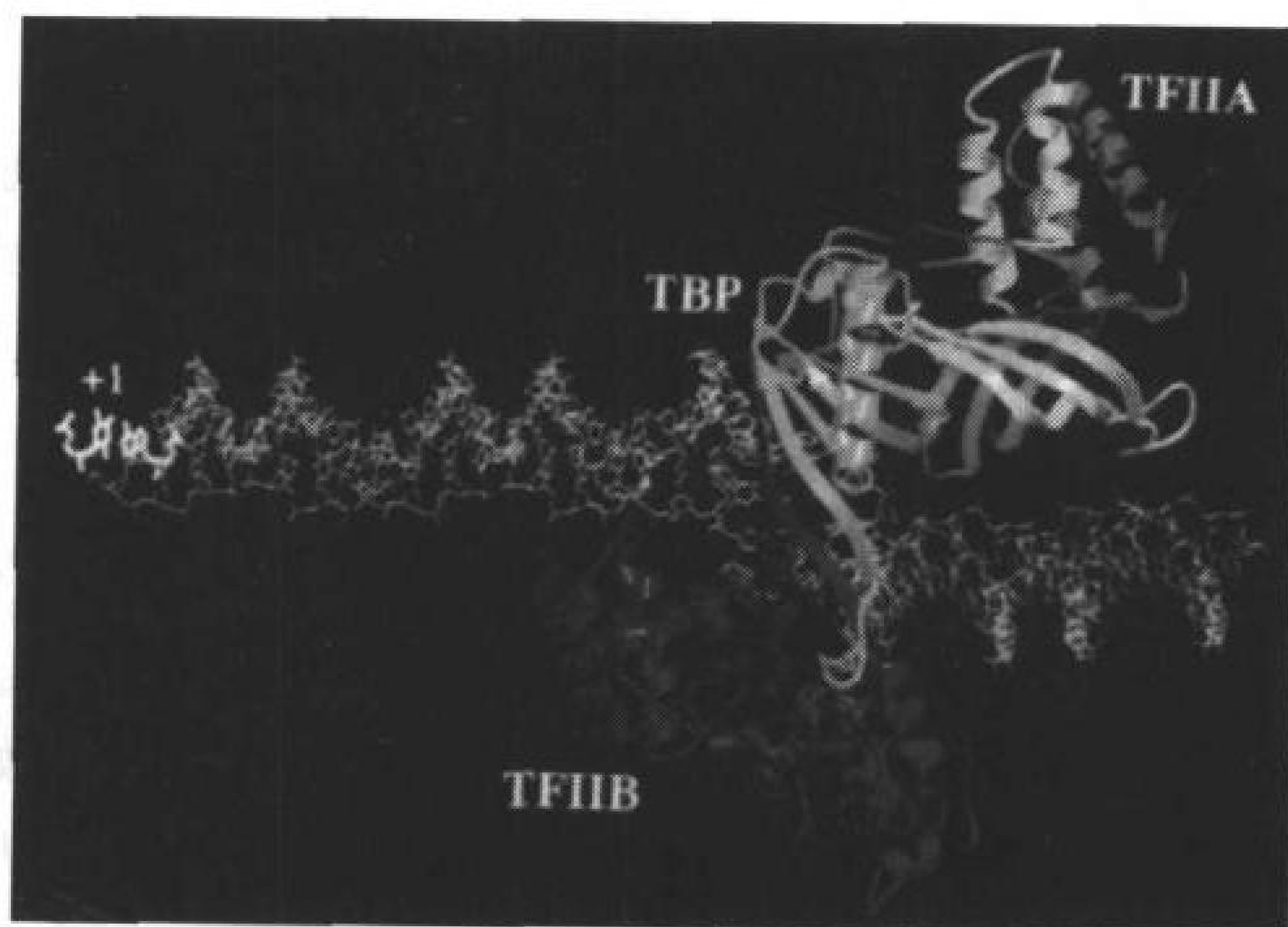


图25-15 TFIIA-TBP-TFIIB-启动子复合模型

蛋白质(带式模型)和DNA(白色棍模型)的排列模式，通过独立测定TFIIA-TBP-启动子和TFIIB-TBP-启动子复合物的X射线衍射晶体结构得到确定。在模型中DNA从TATA框两端伸出。假对称的TBP(青色和紫色)，从上面看，引起DNA两个明显的扭曲，使之形成曲柄状。TFIIA(黄色和绿色)和TFIIB(洋红色和红色)与TBP结合，但每一个只结合在DNA一个侧面。转录起始点(+1)在左面。(引自Stephen Burley, The Rockefeller University)

一旦前起始复合物形成，TFIIH的ATP依赖的解旋酶活性刺激开放复合物的形成。TFIIH还有激酶的活性。RNA聚合酶II大亚基C端的可逆磷酸化是转录机器离开启动子进入链伸长期的相关点，看来TFIIF在链伸长期仍在转录机器上，其他GTF可能在转录起始后的某些点解离。保留与启动子结合的TFIID可以促进前起始复合物的组装，从而促进基因的重复转录。 830

某些 RNA 聚合酶 II 的启动子没有 TATA 框,但是这些启动子也需要那些起始含 TATA 框启动子转录所需的一些 GTF 因子,如 TBP。TBP 是如何与无 TATA 框的启动子结合的还不清楚,但看来不像采取与含 TATA 框结合的方式。因此图 25-14 的图示只能看作真核转录起始的柔性框架,而确切的蛋白质因子的需求取决于启动子的性质和其他蛋白质因子的存在。RNA 聚合酶 I 和 III 催化的基因转录需要不同的转录因子,这可以从其启动子的不同组成机构推测到(见节 25-2B),虽然 TBP 在所有情况下都是必需的(因而 TBP 是惟一的通用转录因子)。要阐明真核转录起始的分子基础是困难的,因为许多转录因子在一个细胞中只有几个拷贝,而且在体外可能是不必需的,虽然在体内,它的缺乏是致命的。

3. 转录后加工

转录的初始产物,称为**初始转录物**(primary transcript),但不一定有功能。为了获得其生物学功能,它们许多都必须进行特异的改变:①通过外切或内切除去一些多核苷酸片段;②在其 3′和 5′末端添加核苷酸序列;或③修饰特殊的核苷酸残基。三类主要的 RNA:mRNA、rRNA 和 tRNA 在原核和真核细胞中以不同的方式进行改变。在这一节,我们将简述这个**转录后修饰**(post transcriptional modification)的过程。

A. 信使 RNA 的加工

在原核生物中,大多数初始 mRNA 转录物不需修饰就能进行翻译。事实上,蛋白质的合成在转录完成前就已开始(见节 26-4)。但是在真核生物中,mRNA 在细胞核中合成,却要在细胞质中进行翻译,因此真核 mRNA 转录物在核中就要进行广泛的转录后加工。

真核 mRNA 的加帽

*真核 mRNA 有一个***帽结构**(cap structure),*它是由 7-甲基鸟嘌呤通过 5′—5′三磷酸桥与转录物的起始(5′)核苷酸相连而成*(图 25-16)。特异的**转鸟嘌呤核苷酸酶**(guanylyltransferase)在长到 20 个核苷酸前将帽子加到生长的转录物上。帽子能识别真核翻译的起始位点(见节 26-4A)。帽子也可能通过转录物的第一和第二核苷酸的甲基化而进行修饰,加帽的 mRNA 能抵抗 5′-外切酶的降解。

真核 mRNA 有 poly(A)尾巴

831

真核 RNA 转录物有多种不同的 3′序列,这主要是由于转录终止过程的不精确性。*成熟的真核 mRNA 却有很确定的 3′末端,一般是含有 20～50 个 A 的聚(A)尾巴。*聚(A)尾巴是通过两步酶促反应附加到初始转录物上的:

1)初始转录物被切去高度保守的 AAUAAA 序列后的 15～25 个核苷酸和较小保守的富 U 和富 GU 序列前的约少于 50 个核苷酸。这一切割反应的精确性明显排除了对转录终止的精确要求。

2)通过 **poly(A)聚合酶**[poly(A) polymerase]的逐步作用,从 ATP 形成 poly(A)尾巴。poly(A)聚合酶的活化需要**切割和聚腺苷酸化特异因子**(cleavage and polyadenylation specificity factor,CPSF),这种蛋白因子识别 AAUAAA 序列。当 poly(A)尾巴已长到 10 个残基

时，CPSF 可能从其识别位点脱落，其方式类似于原核 RNA 伸长过程中 σ 因子从转录起始位点的脱落。

poly(A)聚合酶是 500～1000kDa 复合物的一部分，这一复合物还包含 mRNA 切割所需要的一些蛋白质。因此经切割的转录物在它能解离并有可能被细胞核酸酶水解以前就被聚腺苷酸化。poly(A)尾巴最大长度（约 250 核苷酸）可能决定于 **poly(A)结合蛋白**[poly(A) binding protein, PABP]结合的拷贝数。

体外研究发现，poly(A)尾巴对 mRNA 的翻译是不必需的。然而，mRNA 的 poly(A)尾巴随着它在细胞质中老化而缩短，表明 poly(A)尾巴具有保护 mRNA 的功能。事实上，只有丢掉 poly(A)尾巴的成熟 mRNA 和组蛋白 mRNA（当 DNA 复制时，在细胞生活的一个短期内，需要大量的组蛋白），其在细胞质中的半衰期小于 30 分钟，而其他大多数 mRNA 的半衰期是 8 小时或数天。PABP 与尾巴的结合使得整个转录物抵抗核酸酶的裂解。

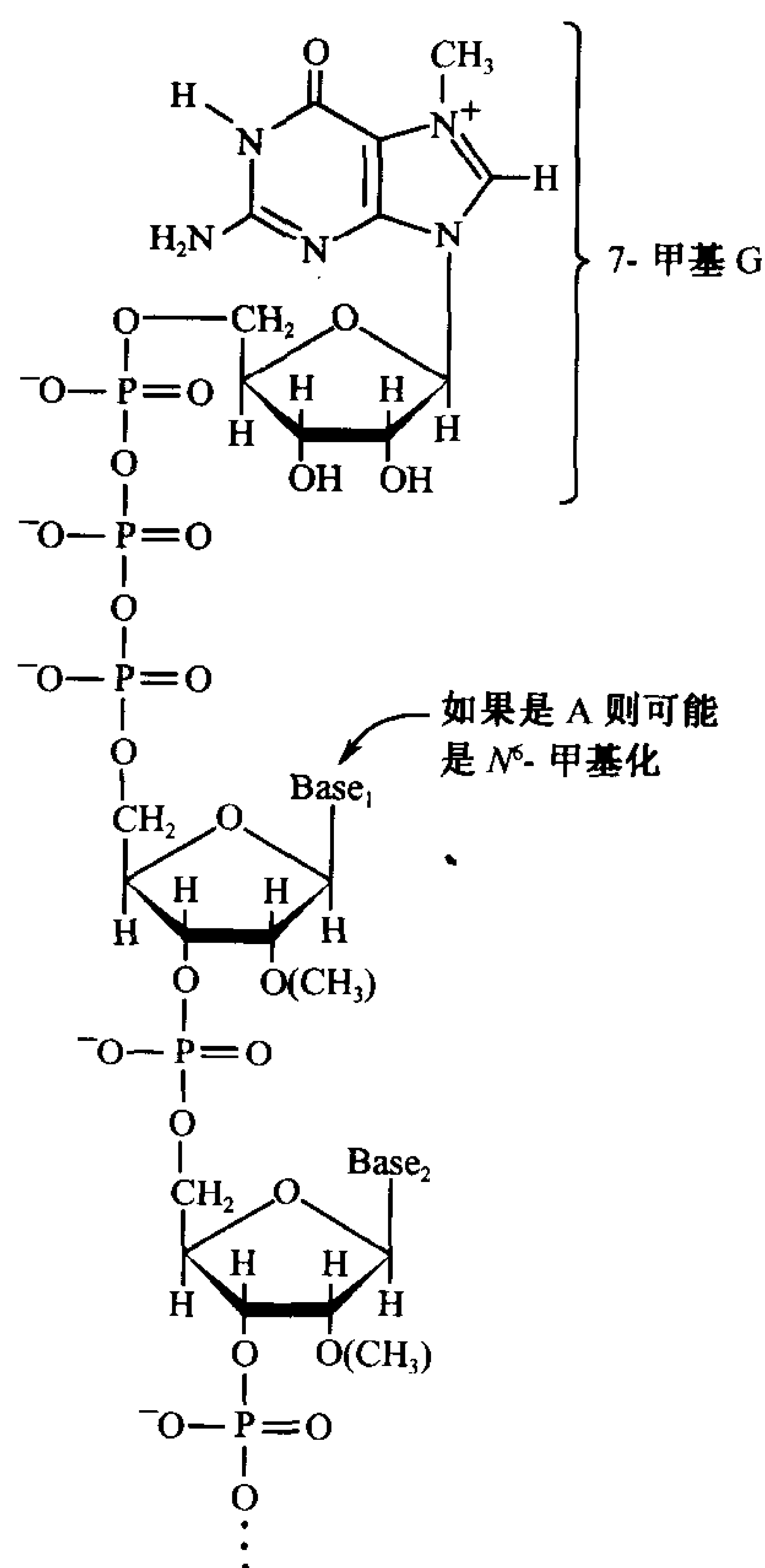


图 25-16 真核 mRNA 的 5′帽结构

转录物的前 2 个核苷酸可能是 O^2-甲基化的。如果第一个核苷酸是 A，那么它可能是 N^6-甲基化。

真核基因含有交替的外显子和内含子

真核和原核结构基因间的最大差别是*在大多数真核基因的编码序列中分散着一些不表达的区域*。初始转录物，也称为**前信使 RNA**(pre-mRNA)或**核内异质 RNA**(hnRNA)的长度不同，而且比从真核蛋白质大小推测的长度要大得多（2000 到大于 20 000 个核苷酸）。快速标记实验表明，只有少量的 hnRNA 被运送到细胞质，它们大多数在核内迅速降解。hnRNA 的 5′帽和 3′尾巴一般仍出现在细胞质 mRNA 上。这一实验结果的直接解释是，前信使 RNA 要进行切割去除一些中间序列，这看来很奇怪，直到 1977 年，Phillip Sharp 和 Richard Roberts 分别独立证明，事实的确如此。前信使 RNA 通过切除非表达的**插入序列**[intervening sequence，称为**内含子**(intron)]，然后**表达序列**[(expressed seqnence)，也称**外显子**(exon)]相互连接在一起，或叫**剪接**(splice)在一起。

一个前信使 RNA 一般含有约 8 个内含子，其总长度平均为外显子长度的 4～10 倍。这一情况以图 25-17 来表示，这是鸡**卵清蛋白**(ovalbumin)mRNA 与卵清蛋白基因（卵清蛋白是蛋清的主要蛋白质成分）反义链（模板链）杂交的电镜图。脊椎动物基因的内含子的长度在 65～200 000个碱基之间。事实上两种脊椎动物相应基因的内含子的长度和顺序都有很大的差异（但数目和位置很少不同）。

833

有翻译功能的真核 mRNA，在整个基因包括内含子转录时就已开始产生（图 25-18），形成前信使 RNA，然后加帽和聚腺苷酸化，剪接形成成熟 mRNA。但在它翻译成蛋白质之前，mRNA 必须被转运到细胞质中，核糖体就在细胞质中（见框 25-3）。

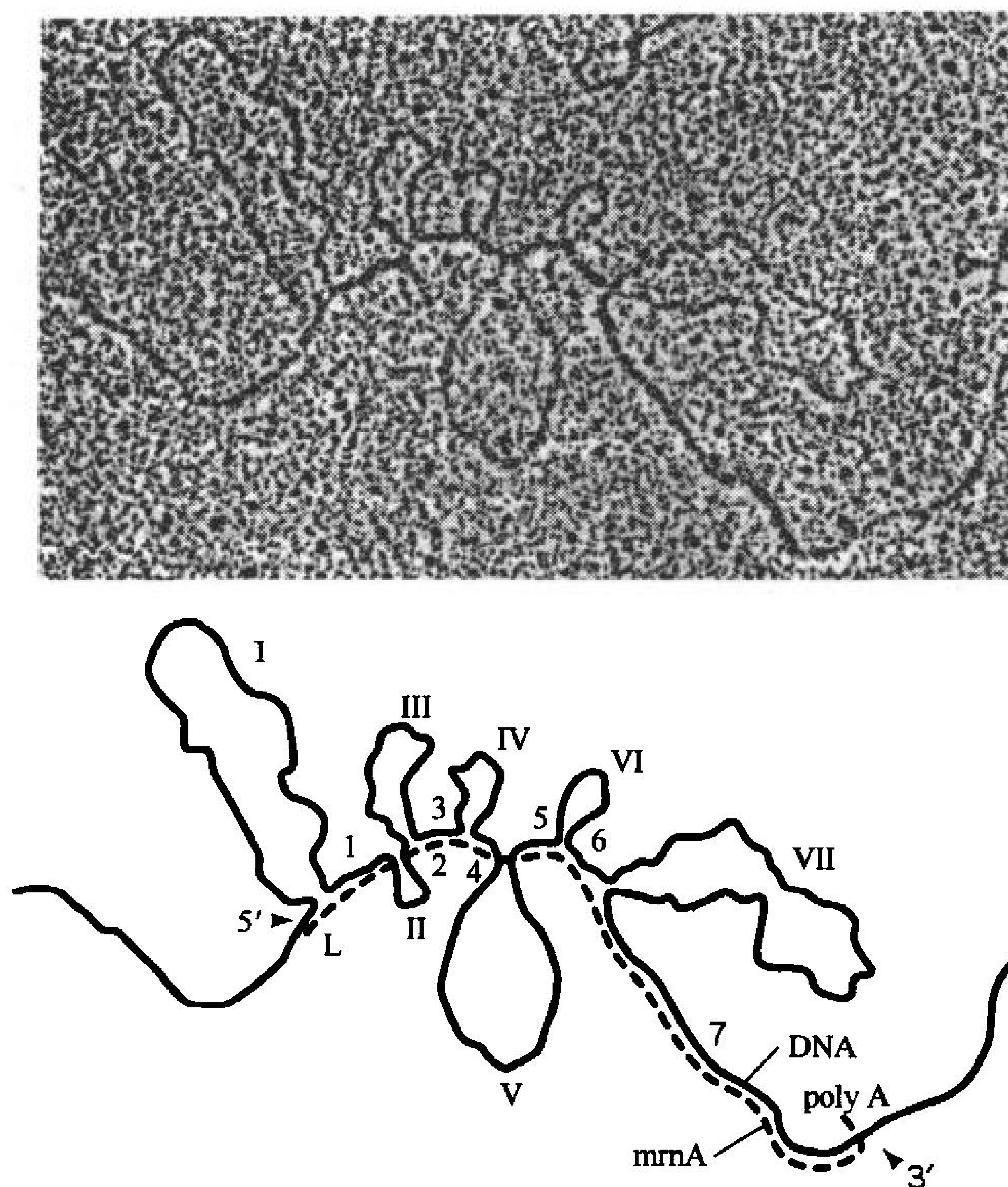


图 25-17 鸡卵清蛋白基因和它的 mRNA

电子显微镜图和相应的手绘图表示鸡卵清蛋白基因的反义(模板)链和它相应的 mRNA 的杂交,DNA(手绘图的紫色线条)和 mRNA(红线)互补片段结合,指明了外显子的部位(L,1~7),成环片段(I~VII)是内含子,它们没有 mRNA 互补序列。[引自 Chamon, P., Sci. Am. 244(5), 61(1981)]

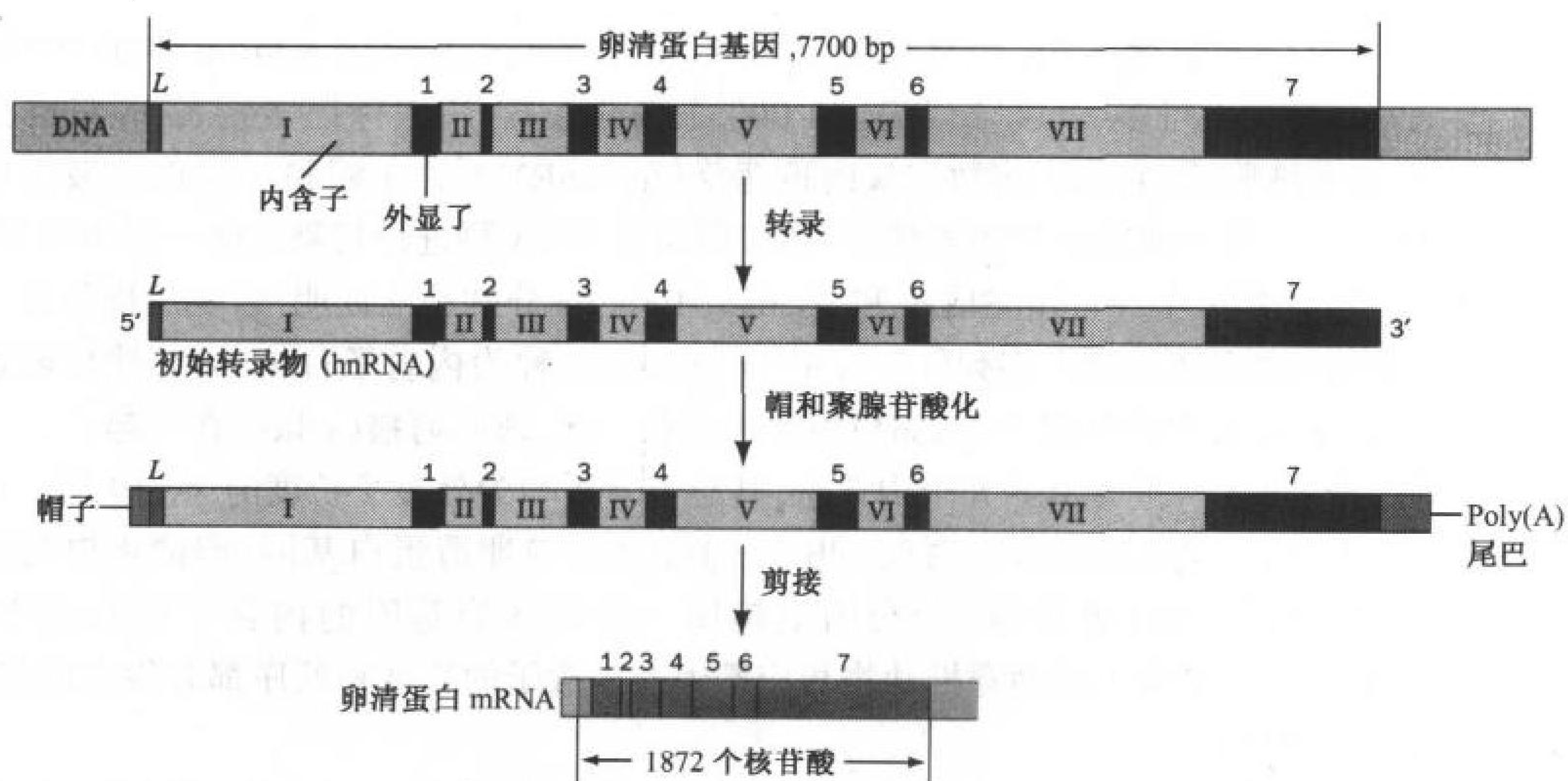


图 25-18 成熟真核 mRNA 形成的步骤

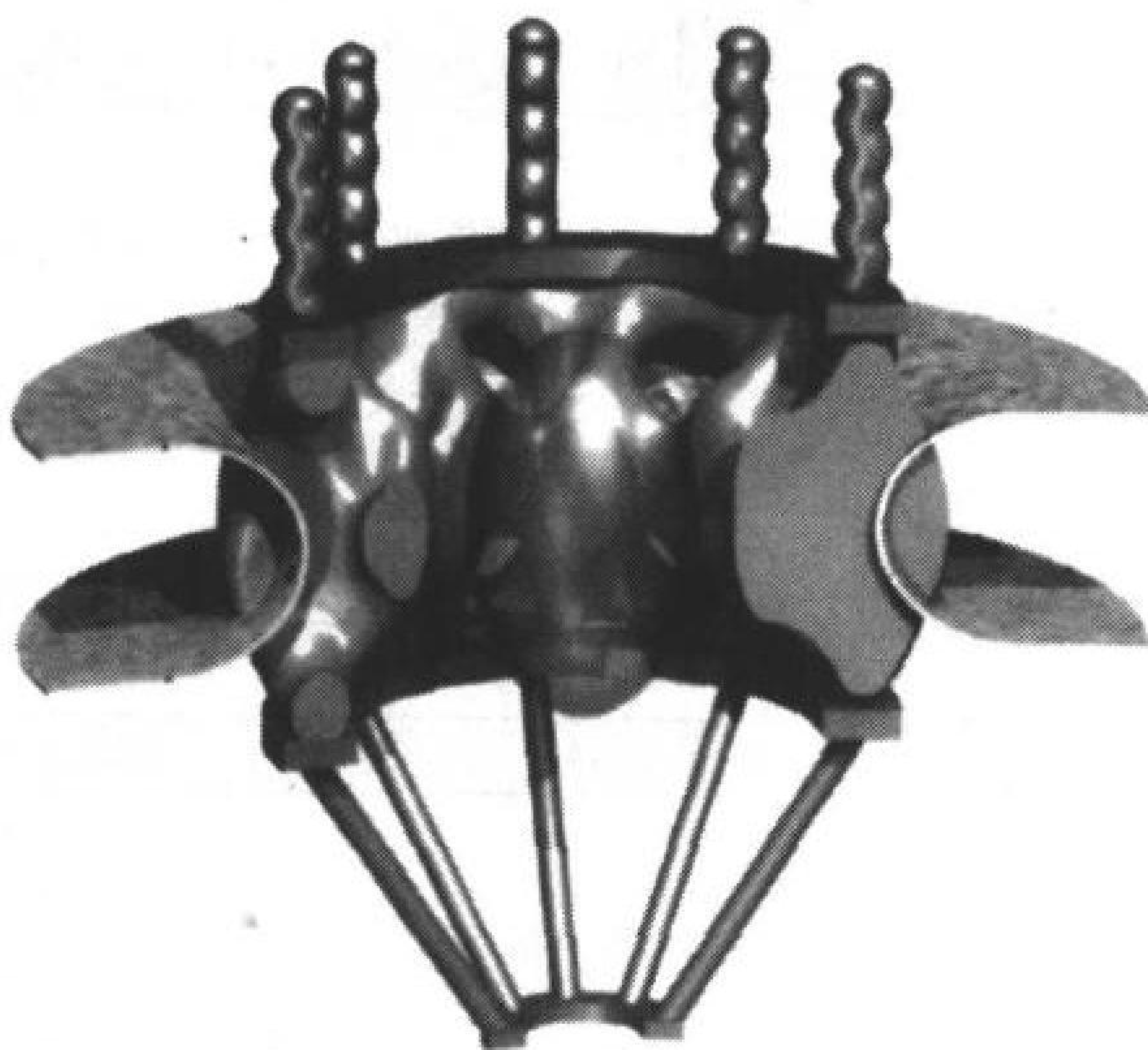
以卵清蛋白基因为例,在转录后,初始转录物进行加帽和聚腺苷酸化,然后内含子被切除,外显子则剪接在一起,形成成熟的 mRNA。

框 25.3 生物化学焦点

核质转运

在真核生物中,许多在核中合成的 RNA 在细胞质中发挥它们的功能。在有些情况下[例如小分子核 RNA(snRNA)]RNA 先运到细胞质进行加工,然后运回核(在 snRNA 情况下,形成剪接体)。核膜由双脂层构成,对大分子进出核的移动是一道难以克服的屏障,RNA 分子和蛋白质分子要通过**核孔复合物**(NPC)进出细胞核,哺乳动物细胞核有上千个核孔复合物。迅速分裂的细胞含有更多。

电子显微技术发现 NPC 是略呈圆柱状,具八重旋转对称,如下面的纵切图所示。细胞质面在上,底部是胞核面,NPC 可能包含上千个 50～100kDa 的蛋白质,NPC 的 9nm 内径允许小于 40～60kDa 的溶质分子自由扩散。直径大于 28nm 的大颗粒则通过耗能方式运过长约 100nm 的 NPC。



将要运入核的蛋白质含有基本的序列,该序列能被转运机器识别。有意思的是,小到能自己扩散通过 NPC 的组蛋白,却也要靠介导途径进入核。RNA 通过 NPC 转运的信号还不清楚,但它可能与 RNA 结合蛋白相关,每一种 RNA 有不同的识别系统。例如 rRNA 是以含有 rRNA 和核糖体蛋白的**前核糖体颗粒**进行移动,mRNA 的移动可能需要一些蛋白质,如**帽结合复合**物或其他与 mRNA 结合形成的**核异质核蛋白**(heterogeneous nuclear ribonucleoproteins, hnRNP)。

载体蛋白,如输入蛋白或转运蛋白,是核质运输必需的,它们如 Ran,是 GTP 酶。NPC 不含可识别的"运动"蛋白,如肌球蛋白,但 Ran 的 GTP 酶活性(它们类似于信号转导系统中的 G 蛋白)说明转运物靠单向棘齿轮机制通过 NPC 是依赖于蛋白质构象变化来实现的。转运后,RNA 或蛋白质转运物与它们的载体蛋白质解离,这样载体可以循环使用。决定转运方向性的信号(特别对那些能进入核的物质如 snRNA)还有待阐明。

[图片引自 Nigg, E. A. Nature 386, 780(1997)]

外显子的剪接是一个两步反应

834

多种类别真核外显子-内含子连接序列的比较研究发现,它们有极高的同源性(图 25-19),它们往往在内含子的 5′交界处有不变的 GU 和 3′交界处有不变的 AG,这些序列对于剪接点连接是必需的和足够的。剪接反应是通过两个转酯化反应发生(见图 25-20)。

1)在一个内含子腺苷残基和其他内含子 5′末端磷酸基团之间,形成 2′,5′-磷酸二酯键,这样 5′外显子就释放出来,而内含子形成**马套结构**(lariat structure)(由形状而得名)。马套分支点上的腺苷一般位于 3′剪接点上游 20～50 个残基的保守序列上,如果在这个分支点上的 A 残基发生突变,这一位点的剪接将不能进行。

2)5′外显子的游离 3′-OH 代替内含子的 3′端,与 3′外显子的 5′末端磷酸形成磷酸二酯键,从

835

而形成剪接产物,而内含子则在马套中被排除,并在体内很快被降解。如果 3′剪接点保守的 AG 突变,则第二步反应被阻断,虽然它们不干扰马套形成。

注意,剪接过程不需要自由能的消耗,转酯化反应保存了来自磷酸二酯键断裂的自由能,第一步催化过程可能需要金属离子。

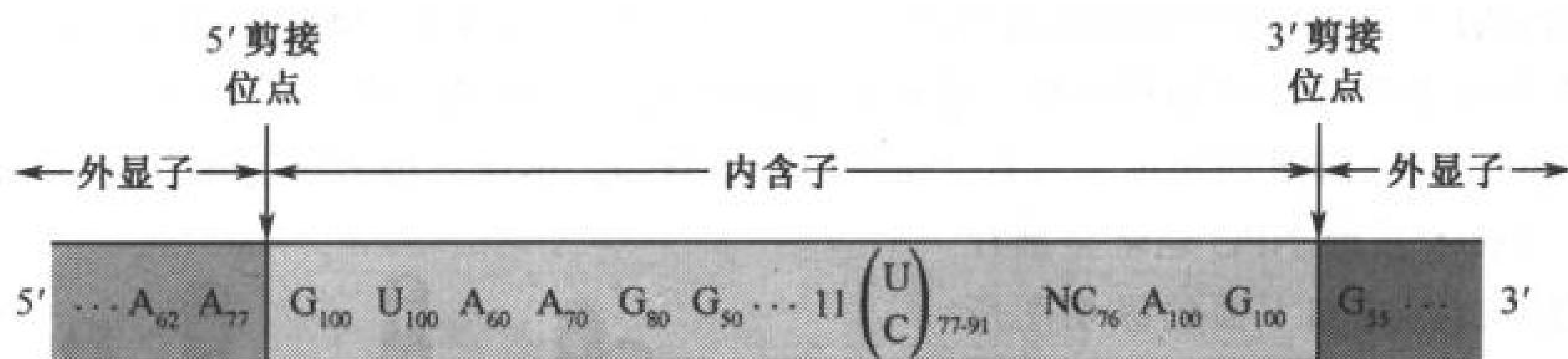


图 25-19 真核前信使 RNA 的外显子-内含子剪接点的共同保守序列

下行数字表示特殊碱基在前信使 RNA 该位点出现的百分数。注意在 3′剪接点前有 11 个主要是嘧啶核苷酸。

[引自 Padgett, R. A., Grabowski, P. J., Konarska, M. M., Seiler, S. S. and Sharp, P. A., Annu, Rev. Biochem. 55, 1123(1986)的数据]

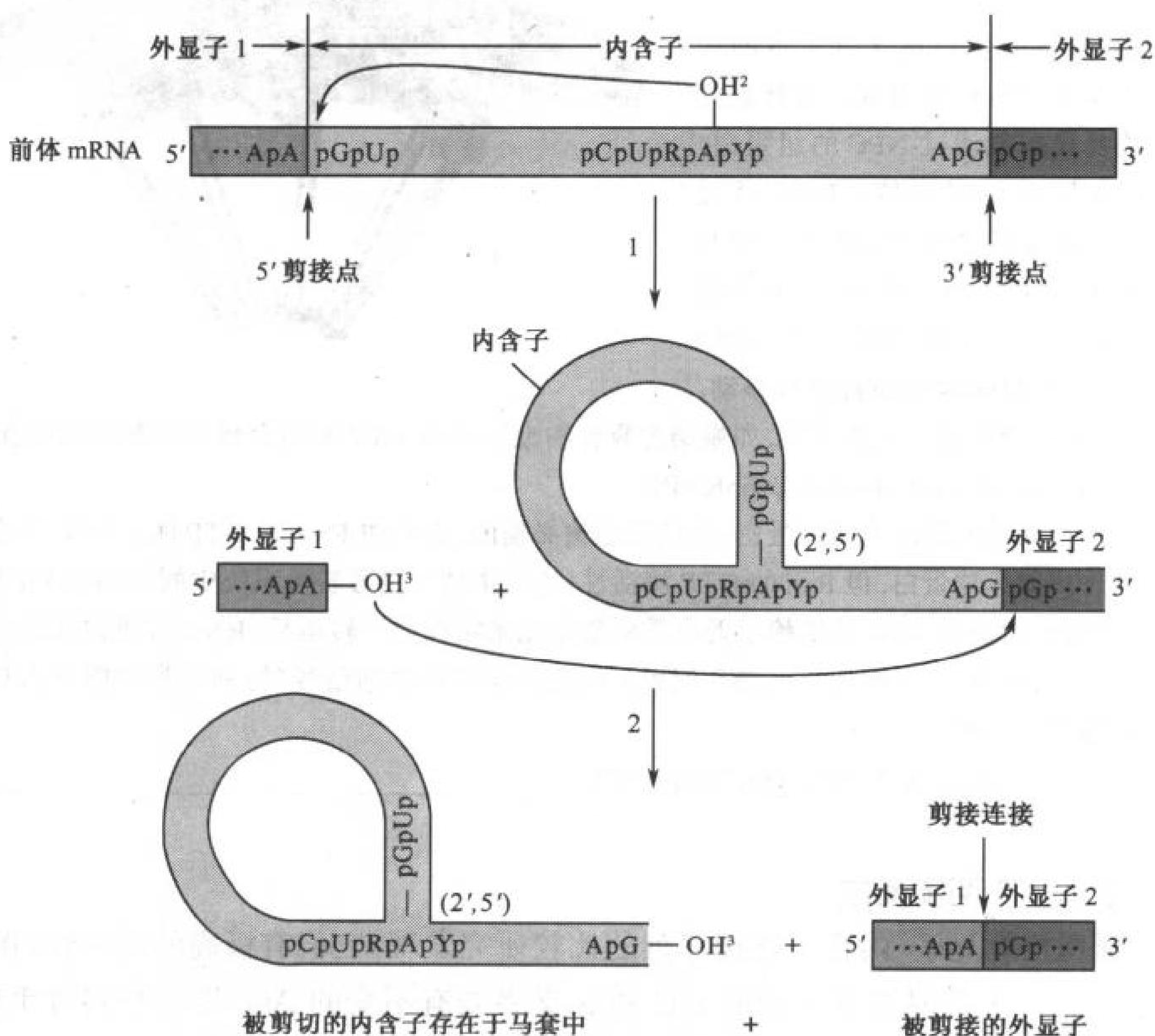


图 25-20 *功能的秘诀*:接合反应

两步转酯化反应将真核前信使 RNA 中的外显子剪接在一起,外显子和内含子画成蓝色和橙色,R 和 Y 分别代表嘌呤和嘧啶残基。(1)特异内含子 A 残基上的 2′-OH 基团亲核攻击 5′外显子交界处的 5′磷酸来移走 5′外显子的 3′末端,从而形成 2′,5′磷酸二酯键和形成马套结构。(2)释放出的 3′-OH 攻击 5′末端残基上的 5′磷酸,形成 3′,5′-磷酸二酯键,从而移去马套中的内含子,并将两个外显子剪接在一起。

snRNP参与剪接过程

在剪接过程中,剪接位点是如何识别的?两个外显子又是如何被连接在一起的?这一问题的部分答案来自Joan Steitz的假设,即一个RNA分子能被另一个RNA分子最佳识别。真核细胞核中有大量高度保守的含60～300个核苷酸的RNA,称为**小核RNA**(small nuclear RNA, snRNA),它们能形成蛋白质复合物,称为**核内小核糖核蛋白**(snRNP;发音为snurp)。Steitz发现,一个这种snRNA的5′末端,称**U1-snRNA**,部分地与5′剪接点的保守序列相互补,显然U1-snRNA能识别5′剪接接头。另外一些参与剪接的snRNP,是**U2-snRNP**, **U4-U6-snRNP**(U4和U6 snRNA通过碱基配对而结合)和**U5-snRNP**。

剪接在大小为50～60S被称为**剪接体**(spliceosome)的颗粒上发生,剪接体将前信使RNA, snRNP和多种前信使RNA结合蛋白聚在一起。这些蛋白质与未成熟mRNA的结合可能导致它们的加工,也是导致hnRNA异质性的原因。一类稀少的内含子,它们的剪接位点是AT和AC(而不是GU和AG)序列,通过含有除U5-snRNA以外的不同组合snRNA的剪接体的作用进行剪接。虽然如此,两类内含子的剪接点的识别和转酯化反应都采取相同的机制。

图25-20的简单化图释说明,任何一个5′剪接点能与任何一个下面的3′剪接点相连接,从而排除所有插入的外显子及与它们连在一起的内含子。正常情况下,这是不会发生的。事实上内含子是逐个或多或少以5′→3′的顺序被切除。哺乳动物基因正确剪接的机制仍是一个谜,因为剪接位点的序列并不是十分保守的,而且内含子往往比它们框起的外显子要大许多倍。事实上,也会发生外显子被缺失或改变3的外显子被置换进成熟mRNA中的剪接过程。因此这种变化了的剪接过程会从一个确定的基因产生不止一种蛋白质产物。这种机制对基因在不同组织中的分化表达特别重要(见节27-3D)。内含子的生物学意义将在框25-4内讨论。

框25-4 生物化学相关内容

为什么内含子要打断结构基因?

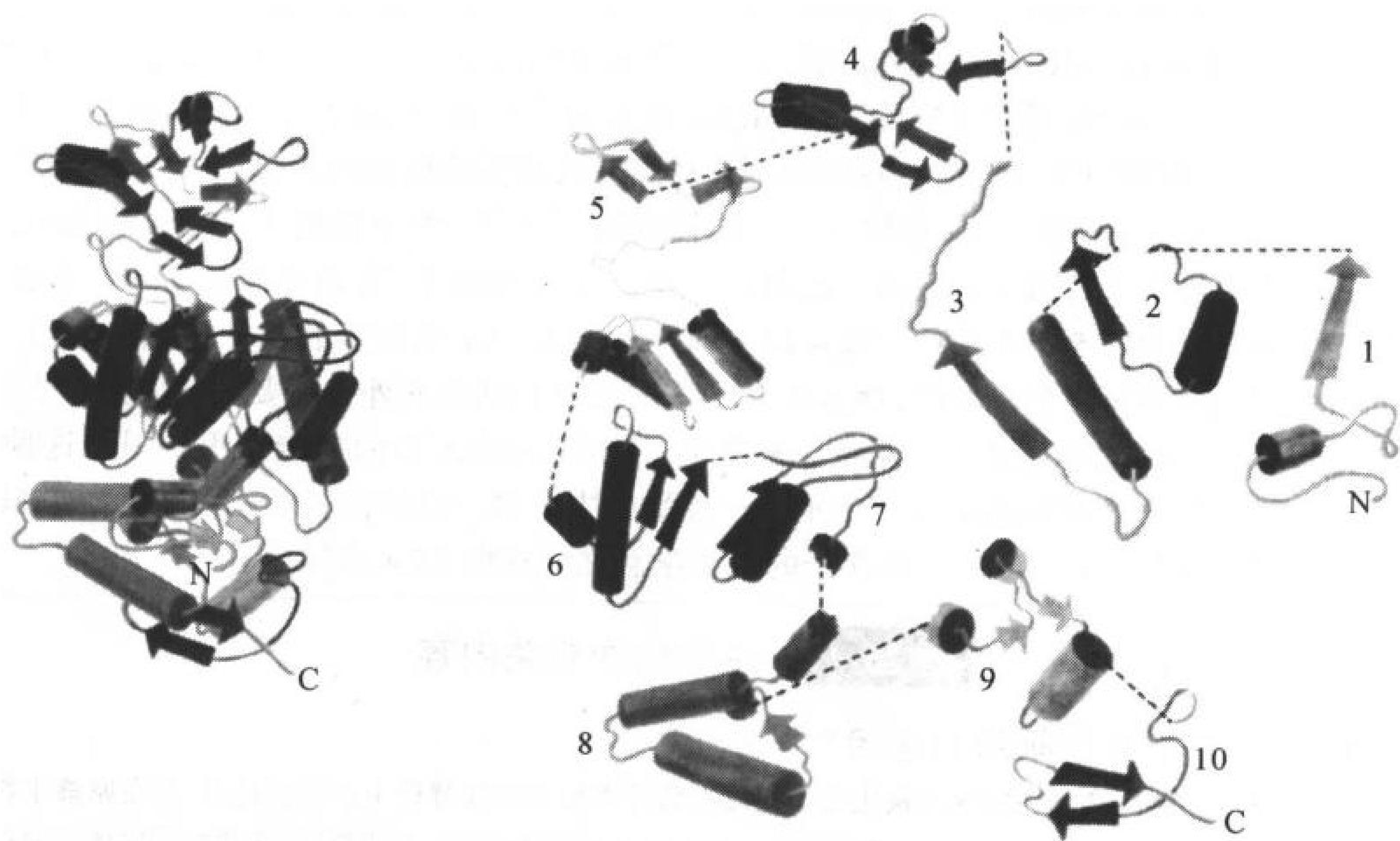
结构基因中的内含子在高等真核生物中要比在低等真核生物如酵母中含量多得多,而在原核生物中极罕见。内含子顶多是一个自私自利DNA(selfish DNA)的例子吗?也就是说,这些核苷酸序列的存在是由于缺乏选择的压力来排除它们?这种假说与原核生物和真核生物的不同生活方式相吻合。由于原核生物的生活方式要求简单化和小型化,因此希望选择性地排除内含子。因而剪接机器的复杂性和高度保守性说明,由内含子和外显子组成的所谓剪接基因有(或曾经有)其选择的优越性。

有两种企图解释断裂基因起源和功能互相竞争的理论。在早内含子理论(introns-early theory)中,外显子是微小基因(minigene)的后代,内含子则是微小基因间的间隔序列的后代,现代的蛋白质是由一系列外显子组装而来的,而残存的序列,即内含子,还继续存在于高等有机体中,不过已从细菌基因组中被清除掉。支持这一理论的事实是,在一些结构基因中,外显子就是一些结构成分确定的蛋白质。大多数外显子要编码一个完全的球蛋白的结构域是太小了,但足够编码相应二级结构基序的片段,这可以从丙酮酸激酶中看到。下页是猫肌肉丙酮酸激酶亚基的结构,它的10个外显子用不同的颜色标示,图右将蛋白质结构片段按其外显子的分界分开来。注意,丙酮酸激酶基因的10个外显子编码了蛋白质二级结构独立的成分,而大多数内含子标定了多肽链转向的位点。说明丙酮酸激酶基因是由编码较小蛋白的单位联合而成的。

对某些蛋白质,调变组合的证据更加惊人。许多蛋白质组合体,如纤连蛋白和其他一些脊椎动物蛋白,是由分离的外显子编码的,这种模式在新产生的蛋白质中要比原始蛋白(它们存在于原核和真核生物中)更普遍。另外,原始基因的分析表明,内含子没有避免打断二级结构成分的明显趋势。

内含子起源的第二个理论解释了这些矛盾。这一理论称后内含子理论(introns-late theory),断裂基因是由内含子插入没有断裂的原始基因而产生的。这一理论假设,这些原始基因起源时没有内含子的参加,因此在细菌的结构基因没有内含子,因为它们一开始就没有内含子。那么,内含子是从何发生的呢?一种可能性是内含子是转座子的残余(见节 24-6B),由于某种机遇,它们插入了相应结构基因的序列,其证据是一些内含子编码反转录酶类似蛋白或内切核酸酶,这说明它们具有移动的潜力。当然,转座子类成分出现在内含子中,也可以简单地解释为没有选择的压力去将这些基因组中不十分重要的片段排除掉。

另一种可能性是结构基因内含子是逆剪切的产物,它是由形成 rRNA 基因内含子的自剪切成分介导的。事实上,一些四膜虫(*Tetrahymena*)内含子在体外发生逆剪接反应,但是这种情况不能作为真核生物剪接机器产生的依据。



正在产生的有关基因组结构的信息有可能最终提供另外一些钥匙来打开断裂基因的起源和功能之谜。人类基因组的一些部分,过去曾认为是无用的或是"垃圾"DNA,现在发现在基因结构和调节中具有作用。因此可能在大的基因组中,内含子的产生是遗传信息的贮存和表达不可缺少的。

[图片引自 Lonberg, N. and Gilbere, W., Cell 40, 84(1985)]

mRNA 可能被编辑

真核 mRNA 另一种转录后修饰包括某些 A 残基的甲基化。在少量的例子中,mRNA 进行过**编辑**(edit),这包括碱基的改变、缺失或插入。这一现象是极端的例子,发生在锥虫和相关原生动物中,在那里有数百个 U 碱基被加入和移去,并产生可翻译的 mRNA。不足为奇的是,mRNA 编辑机器包含所谓**引导 RNA**(guide RNA, gRNA),它能与未成熟 mRNA 形成碱基配对并指导它的改变。

837

B. 核糖体 RNA 的加工

E. coli 有 3 类 rRNA,即 **5S、16S 和 23S rRNA**,它们有 **7** 个操纵子,每一个操纵子包含 3 个

rRNA 基因的一个完全相同的拷贝。这些操纵子的多顺反子初始转录物长约 5500 个碱基，除了 rRNA 外，还包含多达 4 个 tRNA 的转录物(图 25-21)。借助于一个或多个加工酶的突变缺损阐明了加工这些初始转录物成为成熟 rRNA 的过程。

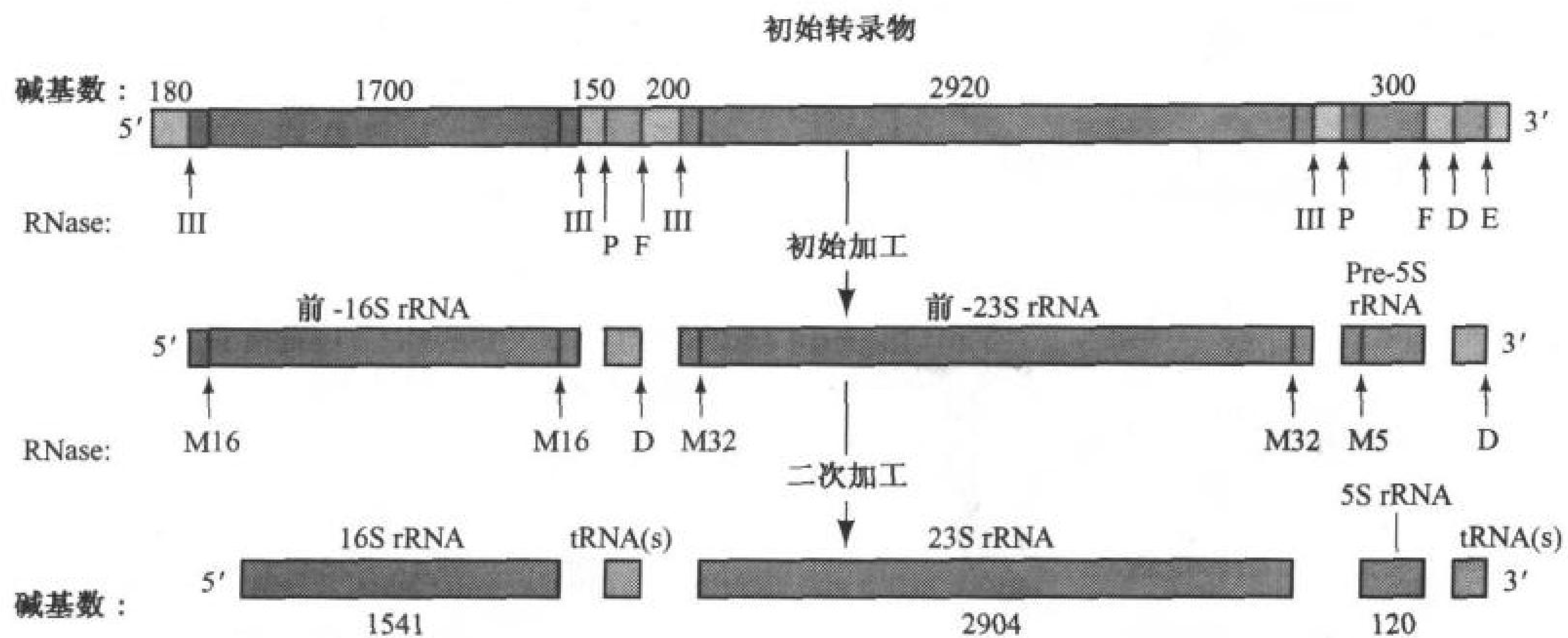


图 25-21 *E. coli* rRNA 的转录后加工

转录图按比例显示，箭头指出不同核苷酸裂解位点和进行这些裂解的酶。[引自 Apiron, D., Ghora, B. K., Plantz, G., Misra, T. K., and Gegenheimer, P., in Söll, D., Abelson, J. N., and Schimmel, P. R. (Eds.), Transfer RNA: Biological Aspects, p. 148, Cold Spring Harbor Laboratory(1980)]

当初始转录物还在合成过程中时，初始加工就已开始，并产生称为**前 rRNA**(pre-rRNA)的产物，它包含 **RNaseIII**、**RNase P**、**RNase E** 和 **RNase F** 的特异裂解位点，如图 25-21 所示。对裂解位点的识别可能基于它们的二级结构特征。

前 rRNA 的 5′和 3′末端在二次加工中被 **RNase M16**、**M23** 和 **M5** 切割，形成成熟的 rRNA，最终的切割只发生在前 rRNA 与核糖体蛋白结合以后。在核糖体组装过程中(见节 26-3)，rRNA 的特异残基被甲基化，这可能是为了保护 rRNA 免受核苷酸酶的不合适的破坏。

838

真核 rRNA 的加工

真核基因组中总有数百个前后相接的 rRNA 基因拷贝，这些基因在核仁中转录和加工。初始真核 rRNA 转录物是一个长 7500 核苷酸的 **45S RNA**，它包含 **18S**、**5.8S** 和 **28S** rRNA，它们被间隔序列隔开(图 25-22)。加工的第一步，在 45S RNA 的约 110 个位点进行甲基化，这些位点大多数在 rRNA 序列上。约 80% 的甲基化产生 ***O*$^{2'}$-甲基核糖**，其余的甲基化产生甲基化碱基如 ***N*^{6}, *N*^{6}-二甲基腺嘌呤**(N^6, N^6-dimethyladenine)和 **2-甲基鸟嘌呤**(2-methylguanine)。45S RNA 以后的断裂和切除基本上与原核 rRNA 相似。事实上，真核生物有类似 RNaseIII 和 RNaseP 活性的酶。真核核糖体含有 4 种不同的 rRNA(见节 26-3)。第 4 类，即 5S 真核 rRNA，以类似于 tRNA 的方式分别进行加工(见节 25-3C)。

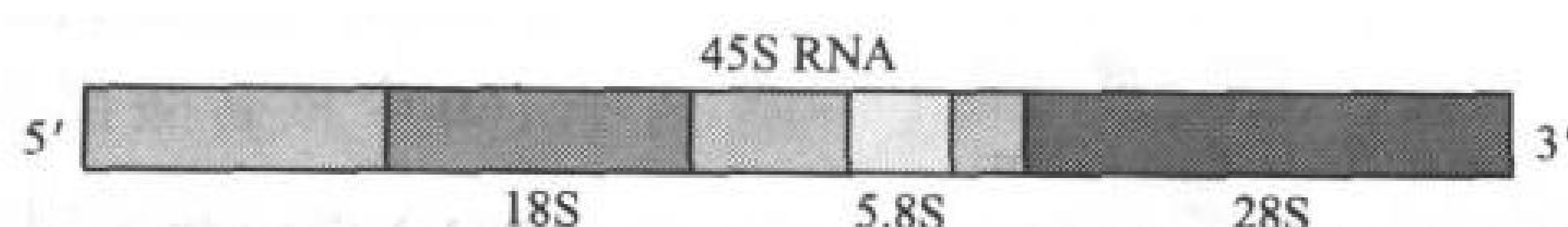


图 25-22 真核 rRNA 的初始转录物 45S RNA 的结构

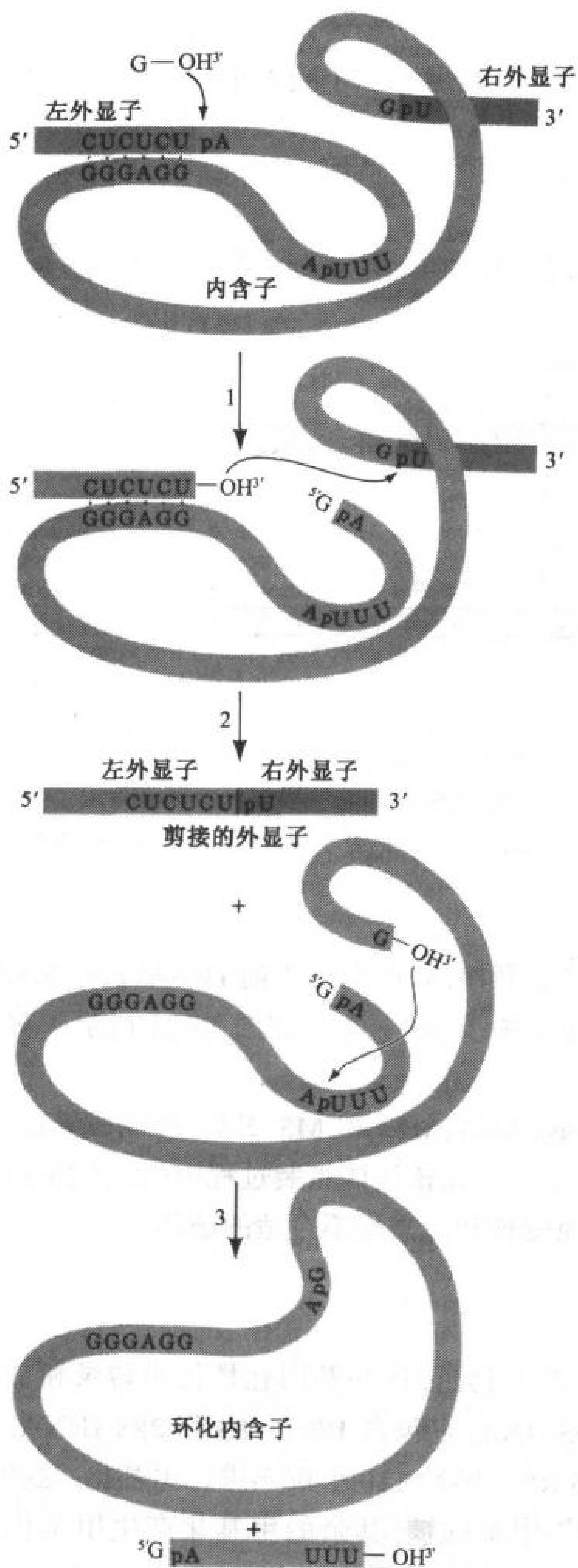


图 25-23 四膜虫前 rRNA 自剪接的反应顺序
(1)鸟苷的 3′-OH 基攻击内含子 5′端磷酸形成磷酸二酯键,移去 5′外显子。(2)新形成的 5′外显子的 3′-OH 基攻击 3′外显子的 5′末端磷酸,将两个外显子剪接在一起,并移去内含子。(3)内含子 3′-OH 基攻击离 5′端 15 位的核苷酸的磷酸,使内含子环化并移去 5′末端片段。在整个过程中,RNA 维持折叠的、以氢键相连的构象,保证内含子精确切除。

有些真核 rRNA 是自我剪接的

只有少数真核 rRNA 基因含有内含子。1982 年,Thososcech 在研究四膜虫的这些基因是如何进行剪接时,得到一个惊人的发现:*RNA 能作为酶起作用*。当从这种生物体分离出来的前 rRNA 与鸟苷或游离鸟苷酸(GMP、GDP、GTP)温育时,在没有蛋白质的情况下,它的一个 413 个核苷酸的内含子自我切除并能将外显子剪接起来;也就是说,前 rRNA 能*自我剪接*。这一加工包含类似于 mRNA 加工的三步反应(图 25-23)。

1)鸟苷的 3′-OH 基攻击内含子的 5′端,移出 5′外显子的 3′-OH 基,与内含子的 5′端形成一个新的磷酸二酯键。

2)5′外显子被释放的 3′末端 OH 基攻击 3′外显子的 5′-磷酸,形成一个新的磷酸二酯键。然后将两个外显子剪接在一起,并移去内含子。

3)内含子的 3′末端 OH 基攻击离内含子末端 15 个残基的核苷酸的磷酸,移去 5′端片段并使 3′末端片段成环状产物。

自剪接过程包含一系列转酯化反应,因此不需要消耗自由能。图 25-23 所示的自剪接 RNA 称为 I **型内含子**(group I intron),它发生在多种真核生物(不包括脊椎动物)的核、线粒体和叶绿体中,也在某些细菌中发生。II **型内含子**(group II intron)发生在霉菌和植物的线粒体和叶绿体中,它的反应是通过马套中间物,而不需要外部核苷酸的参与。

虽然 Cech 发现 RNA 催化剂之初十分令人震惊,但*没有理由认为 RNA 或任何一种大分子不能有催化活性*,作为有效的催化剂,一个大分子应当能产生稳定的结构,正如我们在节 23-2E 看到的,许多 RNA(如锤头核酶,图 23-25)能够做到。

Jennifer Doudna 测定了四膜虫自剪接内含子 160 个核苷酸部分的 X 射线衍射结构,这个 RNA 是已知结构中最大的,它能自发地折叠成碱基处于双螺旋堆积的发夹结构(图



图 25-24 四膜虫自剪接内含子的催化结构域的一部分的 X 射线衍射结构
160nt 的 RNA 形成紧密堆积的结构，有两套双螺旋并肩相连。参与发夹臂特异连接的残基用红色和橙色标出。(引自 Jennifer Doudna, Yale University)

25-24)。序列比较分析和模型构建显示，有一短的保守寡核苷酸序列起到稳定内含子的三级结构的作用(图 25-24 中绿色、红色和橙色部分)。事实上，在四膜虫内含子中，一个小到只有两个相连 A 残基的结构基序起到稳定的作用。广泛的氢键和用一个或多个磷酸基团中的氧(O)络合的 Mg^{2+} 造成一种内部紧密且溶剂不能进入的结构，这一结构与酶蛋白的内部结构十分相似。从这个结构看，RNA 的明显特征是，它的 2′-OH 可以作为与磷酸、碱基和其他 2′-OH 形成氢键的供体和受体。这也解释了为什么单键 DNA 不能形成紧密结构，产生有效的活性部位。

剪接体的 snRNA 成分可能来自原始的自剪接 RNA，snRNP 的蛋白质成分主要用于形成精密卷曲的核酶结构和功能。同样，核糖体的 RNA 成分除了有一般认为的识别和结构功能，也肯定应当有催化功能(见节 26-3)。所有这些 RNA 的活性与一个假设相一致，即 RNA 是前细胞时期(被称为 RNA 世界)的原始的生物催化剂。

C. 转移 RNA 的加工

真如在节 23-2E 讨论过的，一个 tRNA 含有约 80 个核苷酸，它们中许多进行了修饰。它们形成三叶草式的二级结构，并有 4 个碱基配对茎(图 25-25)。*E.coli* 染色体有约 60 个 tRNA 基因，它们中有一些是 rRNA 操纵子的成分，其他分散成簇，分布在染色体中。初始 tRNA 转录物，往往含有多到 5 个相同的 tRNA，在每一个 tRNA 序列的 3′和 5′端有多余核苷酸。这些 tRNA 序列的切割和切除与 *E.coli* rRNA 的加工过程相似(图 25-21)，这两个过程使用一些相同的核酸酶。

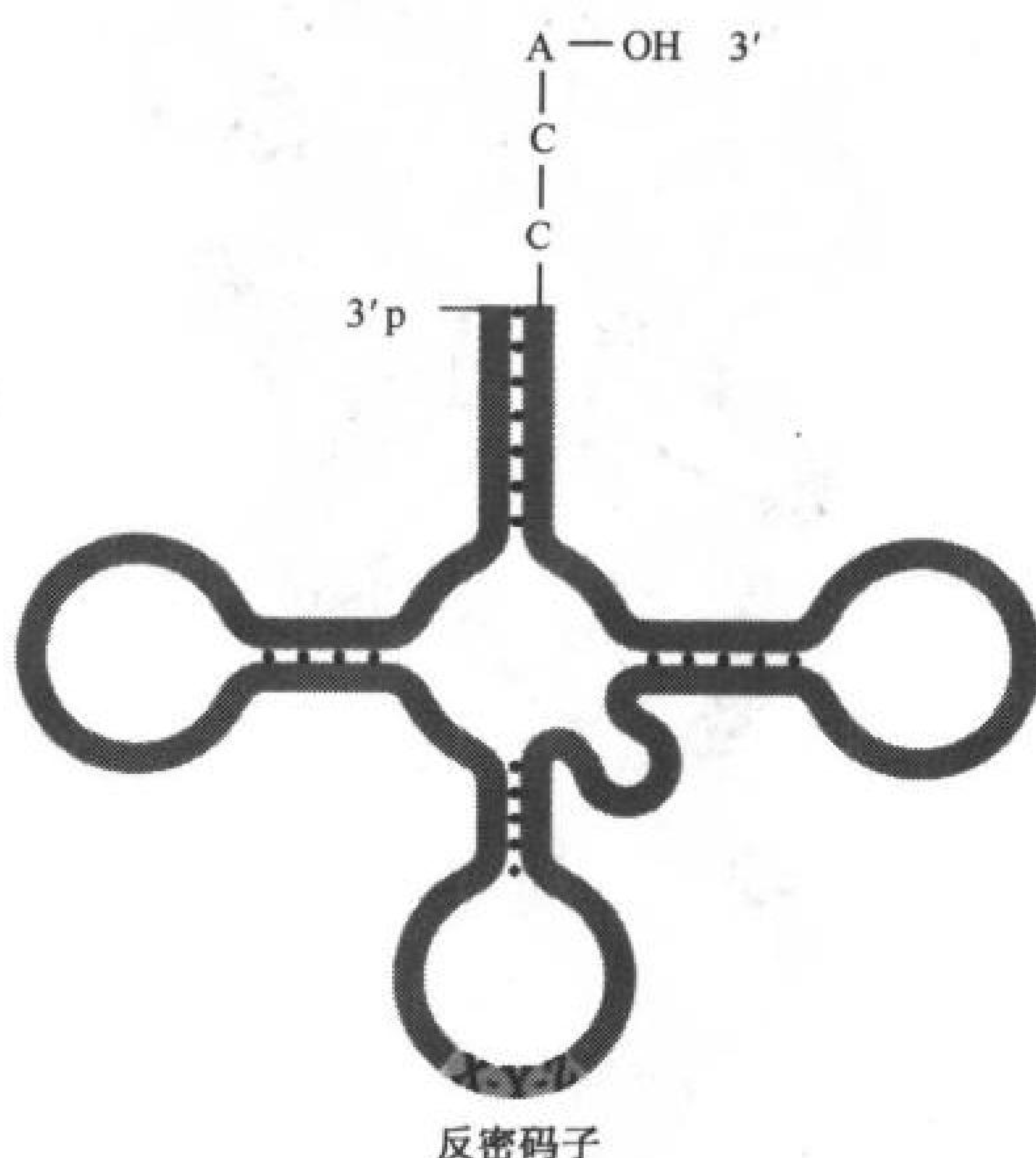


图 25-25 tRNA 三叶草式二级结构的图示
每一点代表氢键连接茎中的碱基对，标出了反密码子的位置(3nt 序列，翻译时与 mRNA 结合)和 3′末端——CCA 的位置。

E.coli RNase P 参与加工 rRNA 和产生 tRNA 的 5′端，它是一个很有意思的酶，因为它的催化活性需要一个 377 核苷酸的 RNA(约 125kDa，RNase P 的蛋白质部分只有 119 个残基，分子质量约 14kDa)。这个 RNA 最初被认为是识别底物 RNA 并引导核酸酶的亚基(被认为是实际的核酸酶)到切割位点。但是 Sidney Altman 已指出，*RNase P 的 RNA 成分事实上是酶的催化亚基，因为实验证明游离的 RNase P 的 RNA 成分在高盐浓度下能催化底物 RNA 的裂解*。RNase P 的蛋白质部分是碱性的，其主要功能是通过静电作用减小多阴离子核酶与它的底物 RNA 间的静电排斥。在真核生物(核、线粒体、叶绿体)和原核生物中都有 RNase P 的活性。

841

许多真核前 tRNA 有内含子

真核基因组含有数百到数千 tRNA 基因。许多真核初始 tRNA 转录物，如酵母 $\mathbf{tRNA^{Tyr}}$(图 25-26)，它有小的内含子和 5′与 3′端的多余核苷酸，因此 tRNA 的加工包括水解移去这些多余的核苷酸。三核苷酸序列，CCA，是连接氨基酸的部位，未成熟 tRNA 转录物中不含有这个序列。它是在 **tRNA 核苷酸转移酶**(tRNA nucleotidyltransferase)催化下先后将两个 C 和一个 A 加到 tRNA 上，用

CTP 和 ATP 作为反应底物(原核 tRNA 初始转录物已包含有 CCA 序列)。

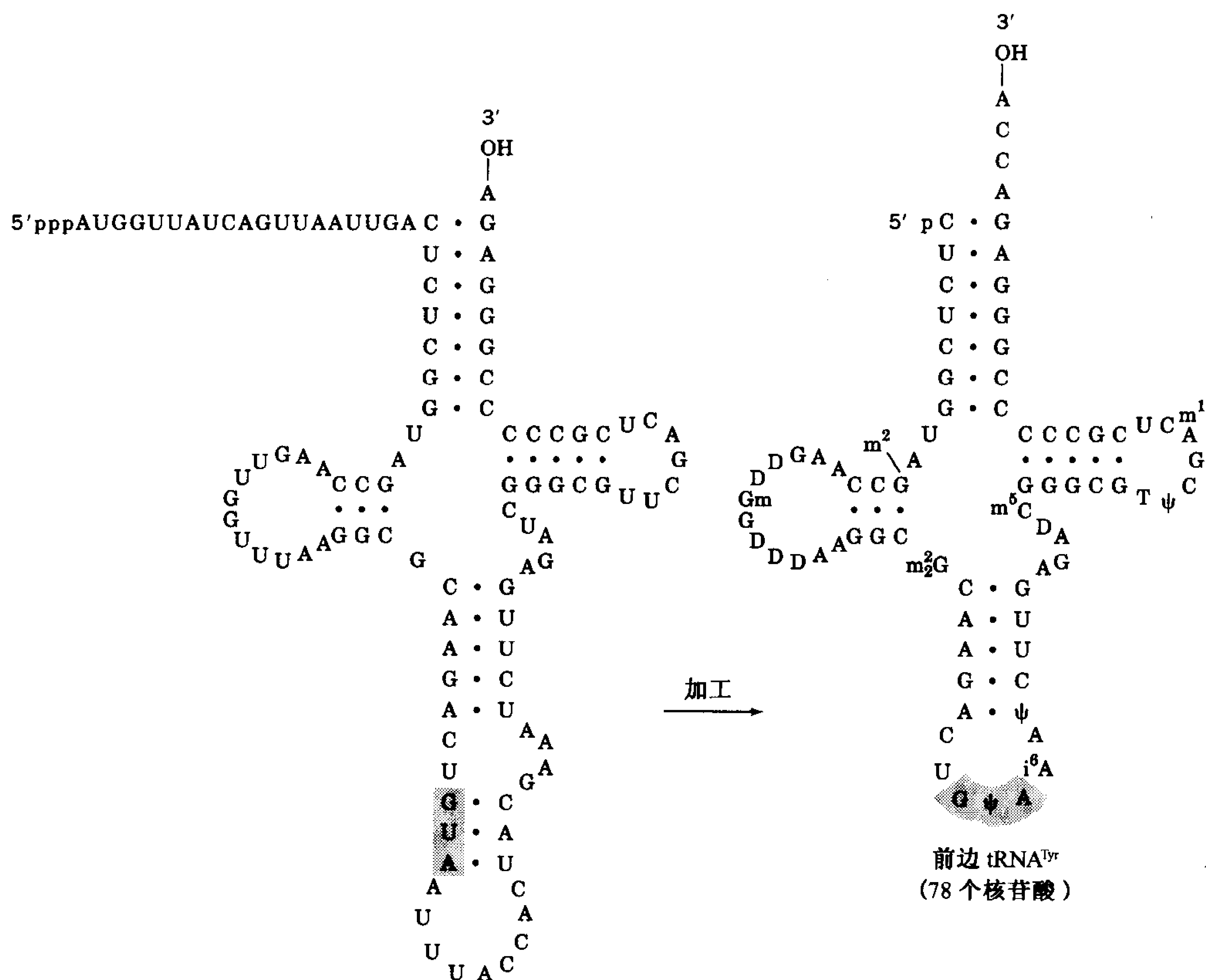


图 25-26　酵母 tRNA^{Tyr}的转录后加工

从初始转录物中切除 14 个间插核苷酸(红色)和 19 个 5′末端核苷酸序列(绿色),CCA(蓝色)通过酶促反应加到 3′端,另外一些残基进行了修饰,最终成为成熟 tRNA。反密码子加了阴影。[引自 DeRobertis, E.M. 和 Olsen, M.V., Nature 278, 142(1989)]

小　结

1. RNA 聚合酶,以一条 DNA 链(反义链或非编码链)为模板,从三磷酸核苷酸合成多核苷酸链。
2. *E. coli* RNA 聚合酶全酶的 σ 因子识别并结合到启动子部位,全酶从那儿起始转录。
3. RNA 合成需要形成开放复合物,合成泡沿着 DNA 移动时,RNA 链在 RNA 聚合酶的催化下伸长。
4. *E. coli* RNA 合成的终止需要转录上的一个特异的二级结构成分,而且可能需要 rho 因子的作用。
5. 真核生物含有 3 种合成不同类型 RNA 的核 RNA 聚合酶。
6. 真核启动子是多种多样的,它们的转录起始位点不同,而且可能有多个上游序列,增强子和沉默子形成调节蛋白的结合位点,这些蛋白质的功能是转录的激活因子或阻遏物。
7. 真核基因的基础转录需要通用转录因子和 RNA 聚合酶,它们按一定的顺序组装成前起始复合物。
8. 大多数真核结构基因的初始转录物要进行转录后修饰,包括加帽、加 3′poly(A)尾巴。含有内含子的 mRNA 要进行剪接,以除去内含子并将外显子接在一起,这一过程是在含有 snRNA 的剪接体参与下进行的两个转酯化反应。
9. 前 rRNA 的加工包括核苷酸链的水解切除和甲基化。一些真核 rRNA 转录物在内含子自己催化下进行剪接。

10.tRNA 转录物要经过核苷酸的加成、切除和修饰加工。

参考文献

翻译

Burley, S.K., The TATA box binding protein, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6,** 69–75 (1996). [Reviews TBP structure and the events of transcription initiation.]

Darst, S.A., Edwards, A.M., Kubalek, E.W., and Kornberg, R.D., Three-dimensional structure of yeast RNA polymerase II at 16 Å resolution, *Cell* **66,** 121–128 (1991).

Greenblatt, J., RNA polymerase II holoenzyme and transcriptional regulation, *Curr. Biol.* **9,** 310–319 (1997).

Liu, B. and Alberts, B.M., Head-on collision between a DNA replication apparatus and RNA polymerase transcription complex, *Science* **267,** 1131–1137 (1995).

Nudler, E., Avetissova, E., Markovtsov, V., and Goldfarb, A., Transcription processivity: protein-DNA interactions holding together the elongation complex, *Science* **273,** 211–217 (1996).

Richardson, J.P., Structural organization of transcription termination factor rho, *J. Biol. Chem.* **271,** 1251–1254 (1996).

Roeder, R.G., The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II, *Trends Biochem. Sci.* **21,** 327–335 (1996).

Tan, S. and Richmond, T.J., Eukaryotic transcription factors, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8,** 41–48 (1998).

Tijan, R., Molecular machines that control genes, *Sci. Am.* **272**(2), 54–61 (1995). [Describes the identification of the components of eukaryotic transcription factors.]

RNA 加工

Apiron, D. and Miczak, A., RNA processing in prokaryotic cells, *BioEssays* **15,** 113–119 (1993).

Cate, J.H., Gooding, A.R., Podell, E., Zhou, K., Golden, B.L., Kundrot, C.E., Cech, T.R., and Doudna, J.A., Crystal structure of a group I ribozyme domain: principles of RNA packing, *Science* **273,** 1678–1690 (1996), *and* Doudna, J.A. and Cate, J.H., RNA structure: crystal clear? *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7,** 310–316 (1997).

Cech, T.R., Self-splicing of group I introns, *Annu. Rev. Biochem.* **59,** 543–568 (1990).

Frank, D.N. and Pace, N.R., Ribonuclease P: Unity and diversity in a tRNA processing ribozyme, *Annu. Rev. Biochem.* **67,** 153–180 (1998).

Nigg, E.A., Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanism and regulation, *Nature* **386,** 779–787 (1997).

Sharp, P.A., Split genes and RNA splicing, *Cell* **77,** 805–815 (1994). [An overview of mRNA splicing by a Nobel prize winner.]

Stoltzfus, A., Spencer, D.F., Zuker, M., Logsdon, J.M., Jr., and Doolittle, W.F., Testing the exon theory of genes: the evidence from protein structure, *Science* **265,** 202–207 (1994).

Symons, R.H., Ribozymes, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4,** 322–330 (1994). [Reviews the naturally occurring ribozymes, including group I introns and RNase P.]

Wahle, E. and Keller, W., The biochemistry of polyadenylation, *Trends Biochem. Sci.* **21,** 247–250 (1996).

关 键 词

信使 RNA　mRNA
核糖体 RNA　rRNA
转移 RNA　tRNA
操纵子　operon
顺反子　cistron
多顺反子 RNA　polycistronic RNA
单顺反子 RNA　monocistronic RNA
启动子　promoter
ribnow 框　Pribnow box
足迹试验　footprinting
开放复合物　open complex
组成酶　constitutive enzyme
全酶　holoenzyme
核心酶　core enzyme
σ 因子　σ factor
诱导酶　inducible enzyme
rho 因子　rho factor
核仁　nucleolus
GC 框　GC box
CCAAT 框　CCAAT box
通用转录因子　general transcription factor
前启动复合物　preinitation complex
TATA 框结合蛋白　TBP
TBP 相关因子　TAF
反义链　antisense strand
有义链　sense strand
编码链　coding strand
初始转录物　primary transcript
转录后修饰　posttranscriptional modification
帽结构　cap structure
poly(A)尾巴　poly(A) tail
异质核 RNA　hn RNA
内含子　intron
外显子　exon
剪接　splicing
非编码链子　noncoding strand
结构基因　structural gene
基因产物　gene product

小核RNA snRNA
剪接体 spliceosome
RNA编辑 RNA editing
引导RNA gRNA
Ⅰ型内含子 group Ⅰ intron
II型内含子 group II intron

学习思考题

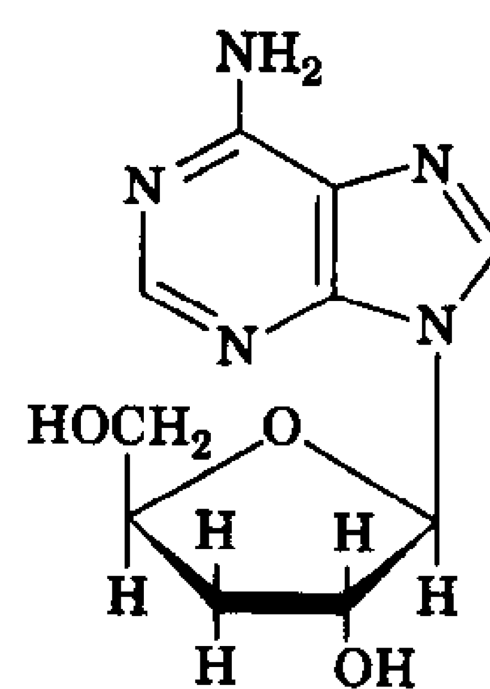
1. 为什么精确定义“基因”很困难?
2. 比较DNA和RNA聚合酶的结构、底物、作用机制、错误率和模板特异性。
3. 基因组成操纵子的优缺点是什么?
4. 什么是共同保守序列?
5. 原核RNA聚合酶核心酶和全酶的不同DNA结合特性的意义是什么?
6. 三类真核RNA聚合酶的功能是什么?
7. 描述真核前起始复合物的组装。
8. 总结真核mRNA、rRNA和tRNA的转录后修饰。
9. 比较mRNA加工和I类内含子加工中剪接的机制。

练 习 题

1. 抗生素蛹虫虫草菌素(cordycepin)抑制细菌RNA的合成。
   (a)蛹虫草菌素是哪一核苷的衍生物?
   (b)解释它的作用机制。
2. 指出下列 *E.coli* $tRNA^{Tyr}$启动子有义链的 -10 区、-35 区和起始核苷酸。

   5′ CAACGTAACACTTTACAGCGGCGCGTCATTTGATATGATGCGCCCCGCTTCCCGATA 3′
   3′ GTTGCATTGTGAAATGTCGCCGCGCAGTAAACTATACTACGCGGGGCGAAGGGCTAT 5′

3. 设计一个六残基核酸探针,能与最大数量 *E.coli* 启动子杂交。
4. 解释为什么在真核基因 -50 位点插入一个5bp的DNA引起RNA聚合酶II转录起始速度降低的程度要比在同一位点插入10bp DNA大。
5. 为什么原核基因 -10 区的G·C碱基对数目越多,其启动子效率越低?
6. 一个真核核糖体含4种不同的rRNA分子和约82种不同的蛋白质,为什么细胞含有的rRNA基因的拷贝数比核糖体蛋白的基因多得多?
7. 设计一个寡聚核苷酸亲和层析系统来纯化真核细胞裂解液中的成熟mRNA。
8. 解释为什么核糖残基的 $O^{2'}$-甲基化能保护rRNA免受RNase的作用。
9. 你认为在高度纯化的体外系统和体内,剪接体催化的内含子的切除是一个可逆过程吗?为什么?
10. 一些病毒的感染会抑制真核细胞中snRNA的加工,解释为什么这有利于病毒基因在宿主细胞中的表达?

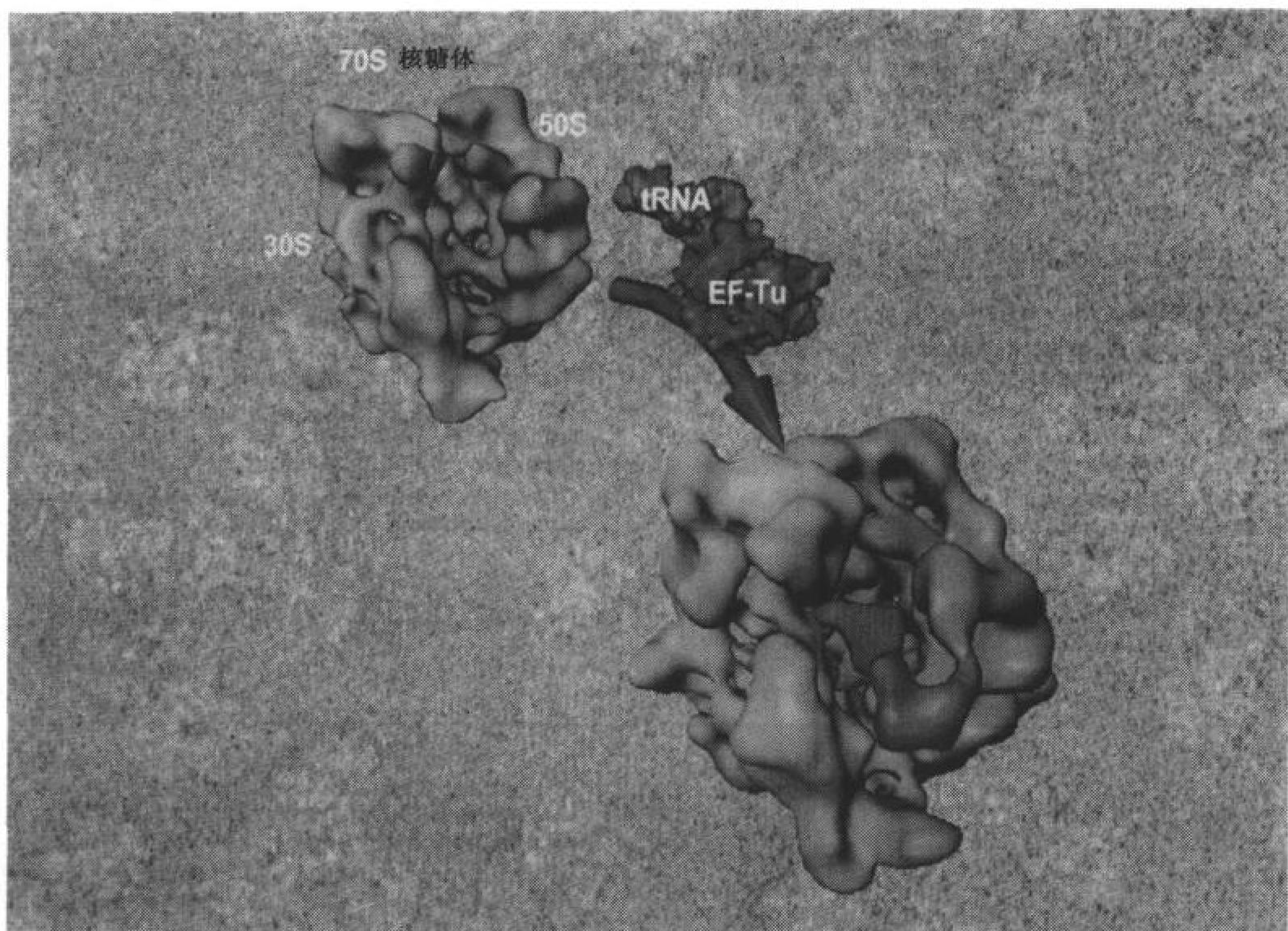


蛹虫草菌素

第1题图

(郑昌学 译)

第26章 翻 译



所有细胞的多肽都是在核糖体中合成的。这种大分子机器的组成成分——蛋白质、rRNA、tRNA和mRNA是如何在如此复杂的过程中相互作用的呢？（引自 Holgar Stark, Imperial College, London, U.K.）

DNA 所编码的遗传信息是如何被解码的呢？上一章我们了解了 DNA 的碱基序列是如何被转录成 RNA 的碱基序列的。本章，我们将考察 RNA 的碱基序列是如何翻译成蛋白质的氨基酸序列的，以此来了解余下的解码过程。作为分子生物学中心法则(DNA→RNA→蛋白质)的第二

个部分，这一过程和核酸代谢的其他主要事件——DNA 的复制以及转录享有许多共同的特征。首先，所有三个过程都是由大而复杂的、含有蛋白质的大分子机器来完成的。这些机器的正常运转依赖于多种特异和非特异性的蛋白质-核酸的相互作用。这些过程的起始、延伸及终止阶段可能还需要辅助因子的参与。此外，和复制及转录一样，翻译必须被精确地执行。虽然翻译涉及互补核苷酸之间的碱基配对，但最终参与形成多聚产物的是氨基酸，而不是核苷酸。这个过程和复制及转录一样是吸能的，需要高能磷酸酐键的断裂。

对翻译的理解除了需要有关于参与多肽合成的大分子的知识之外，还要懂得由氨基酸连接成链的形成机制。氨基酸在链中是严格按照相应的 mRNA 所决定的顺序排列的。因此，本章我们首先要了解**遗传密码**(genetic code)，即核酸序列和多肽序列之间的对应关系。然后我们接着考察 tRNA 和核糖体的结构及性质。最后，我们要探讨翻译机器是如何作为一个协调的整体运作的。

1. 遗传密码

分子生物学中最引人注目的困惑之一，就是仅由 4 种残基构成的核苷酸序列是如何决定多肽链中多至 20 种氨基酸的序列的？很明显，在核苷酸和氨基酸之间不可能有一对一的对应关系。*确定一个氨基酸需要有一组核苷酸，称为***密码子**(codon)。三联体密码，也就是由三个碱基组成一个密码子的密码，足以确定所有的氨基酸，因为碱基的三联体有 $4^3=64$ 种不同的形式。由两个碱基组成一个密码子的二联体密码(有 $4^2=16$ 种可能的二联体)是不够的。三联体密码允许多种氨基酸被不止一个密码子所编码。这种密码借用数学术语来讲是**简并性**(degenerate)。

多肽合成机器是如何把 DNA 连续的碱基序列分组成为密码子的呢？例如，密码可能是互相重叠的，即在序列 A　B　C　D　E　F　G　H　I　J　…中，ABC 可能编码一种氨基酸，BCD 编码另一种，CDE 编码第 3 种等。另一种情况是，密码可能不是重叠的，因而 ABC 确定一种氨基酸，DEF 确定第二种，GHI 确定第 3 种等等。事实上我们将看到，*遗传密码是一种没有重叠的、简并的三联体密码*。一些精密的实验，其中的一些在下文中述及，揭示了遗传密码的本质。

A. 密码子是按顺序解读的三联体

846

在噬菌体 T4 的遗传实验中，Francis Crick 和 Sydney Brenner 发现，导致一个核苷酸缺失的突变可以破坏一个特定基因功能。然而在邻近的不同位置插入一个核苷酸引起的二次突变可以恢复基因的功能。这两个突变被称为互为**抑制突变**(suppressor)，即它们能够各自消除对方的突变性状。在这些实验的基础上，Crick 和 Brenner 总结出：*遗传密码是从基因内的一个固定位置按顺序解读的*。一个核苷酸的插入或缺失会移动**读框**(reading frame)(分组)，随后的核苷酸以密码子为单位被解读。因此，插入或缺失核苷酸被称为**移码突变**(frameshift mutation)。

在进一步的实验中 Crick 和 Brenner 发现，两个相隔很近的缺失或相隔很近的插入却不能互相抑制(恢复基因的功能)，而 3 个邻近的缺失或插入却又可以。这些观察清楚地证实，*遗传密码是一种三联体密码*。

上述原理可用下列类比加以说明，看一个由 3 个字母(碱基)构成的单词(密码子)所组成的句子(基因)：

THE　BIG　RED　FOX　ATE　THE　EGG

这里单词之间的间隔是没有具体意义的，其存在只是为了标明阅读框。第 4 个字母缺失移动了读框，使句子变为：

THE IGR EDF OXA TET HEE GG

因而所有在缺失位点以后的单词都是不可理解的（特指错误的氨基酸）。然而，任何一个字母的插入，比如说在第 9 位上插入一个 X

THE IGR EDX FOX ATE THE EGG

就可以恢复原来的读框。结果是，只有位于两次改变（突变）之间的单词被改换了。如在此例中，这样的句子可能仍然是可以理解的（基因仍然可以编码一个有功能的蛋白），尤其是如果改换紧靠在一起。两个缺失或两个插入，无论如何靠近都不会互相抑制，而只会移动读框。然而 3 个插入，如分别位于第 5、8 和第 12 位的 X、Y 和 Z 就可以把句子变为：

THE BXI GYR EDZ FOX ATE THE EGG

这句子在第 3 个插入之后恢复了原先的读框。3 个缺失同样也是如此，和前面一样，如果所有 3 个缺失改变靠在一起，句子仍可能保留其意义。正如这个文字的类比，*遗传密码是没有内部标点来标识阅读框的，变通的是核苷酸序列按顺序一个三联体一个三联体地被解读。*

由于任何核苷酸序列都可能有 3 个读框，因此至少在理论上，一个多核苷酸有可能编码两种或者甚至 3 种不同的多肽。事实上一些单链 DNA 噬菌体（这些噬菌体据推测必须最大限度地利用其少量的 DNA）含有完全重叠的、具不同阅读框的基因。细菌也显示具有类似形式的编码节约措施。在细菌中，一个基因的多顺反子 mRNA 的核糖体起始序列，常常和其前面基因的末端重叠。

847

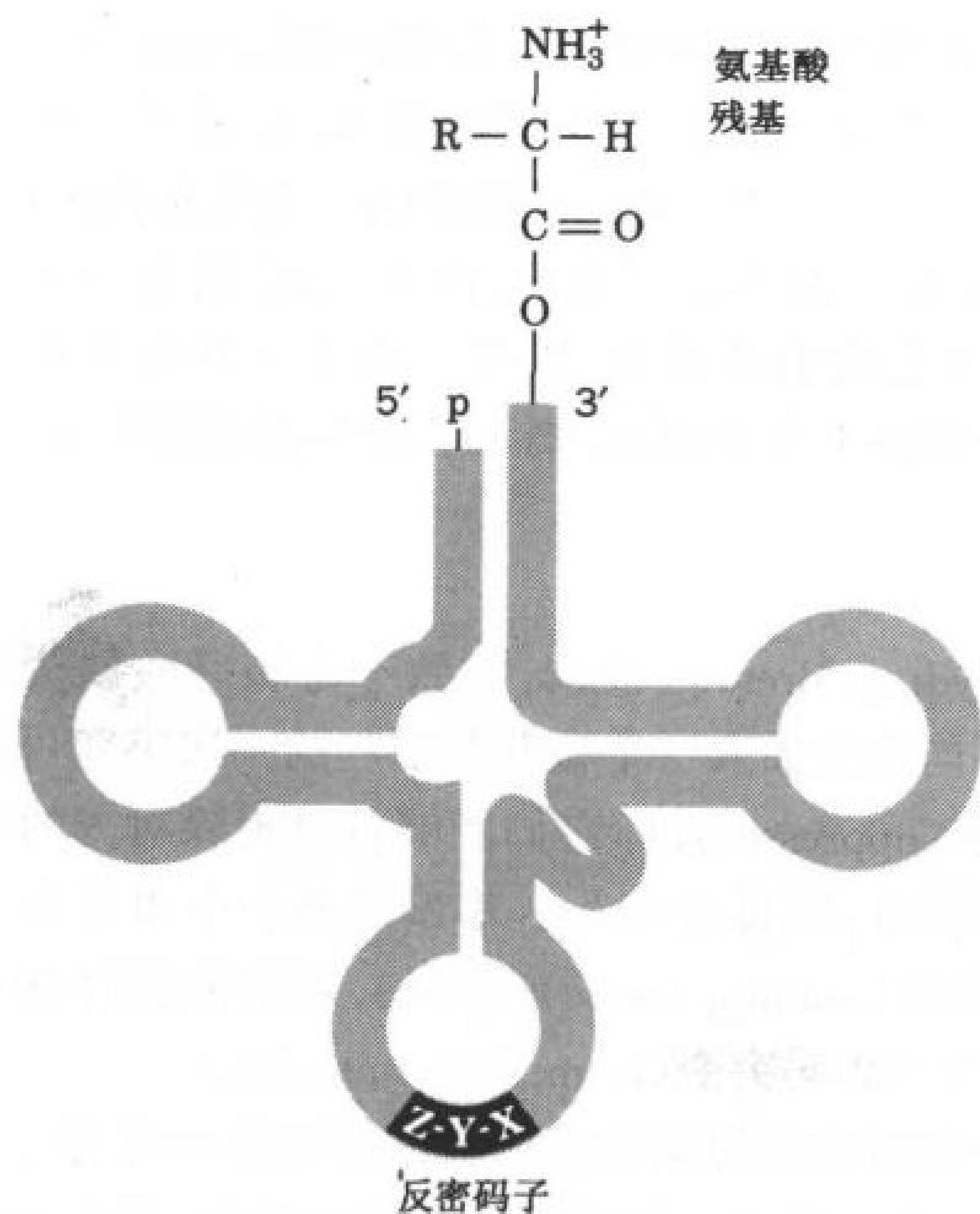


图 26-1 三叶草形状的 tRNA
其共价结合的氨基酸在顶部，其反密码子（一个三核苷酸片段，在翻译过程中与互补的 mRNA 密码子碱基配对）在底部。

B. 遗传密码的解译

为了了解遗传密码字典是如何被阐明的，我们必须首先回顾一下蛋白质是如何合成的。mRNA 并不直接识别氨基酸，*却特异地与 tRNA 分子结合，而每个 tRNA 分子接载一个相应的氨基酸*（图 26-1）。每个 tRNA 含有一段三核苷酸序列，（即其**反密码子**（anticodon），这段序列和 mRNA 上的密码子是互补的，而后者编码该 tRNA 的氨基酸。在翻译过程中，tRNA 携带的氨基酸按顺序连接在一起。在核糖体中，tRNA 的反密码子就是按此顺序和 mRNA 的密码子结合的（图 3-16）。

理论上，遗传密码可以通过简单地比较一个 mRNA 的碱基序列及其所编码的多肽的氨基酸序列进行确定。然而在 20 世纪 60 年代，分离 mRNA 并测定其序列的方法尚未建立。而且合成 RNA 的技术尚不成熟。人们利用一种从固氮菌（*Azotobacter vinelandii*）中得到的**多核苷酸磷酸化酶**，在不使用模板的情况下，把核苷酸连接在

一起：



$$(RNA)_n + NDP \rightleftharpoons (RNA)_{n+1} + P_i$$

这样，NDP 被随机地连接在一起。因此 RNA 产物的碱基组成反映了反应物 NDP 混合物的碱基组成。因而，即使发展出了无细胞翻译体系，遗传密码的阐明被证明仍然是一个困难的工作。

把大肠杆菌温和地破碎，离心去除细胞壁和细胞膜，得到一种粗提物，其中包括 DNA、mRNA、核糖体、酶以及其他蛋白质合成所必需的细胞组分。当加入 ATP、GTP 和氨基酸后，这个系统可以合成少量的蛋白质。当然，一个无细胞翻译体系生产的蛋白质是由细胞的 DNA 决定的。加入 DNA 酶可以在几分钟内阻断蛋白质的合成。因为系统不再能合成 mRNA，而原来存在的 mRNA 很快被降解了。这时可以在该体系中加入纯化的或者是合成的 mRNA，随后可以恢复多肽产物的生成。

1961 年，Marshall Nirenberg 和 Heinrich Matthaei 把合成的多聚核苷酸 poly(U)加入到一个含有同位素标记的氨基酸的无细胞翻译体系中，得到了被标记的 poly(Phe)多肽。他们得出结论：*UUU 必然是编码苯丙氨酸的密码子*。用 ploy(A)和 poly(C)所做的实验分别得到了 poly(Lys)和 poly(Pro)，因而确认了 AAA 是赖氨酸的密码子，而 CCC 是脯氨酸的密码子。

遗传密码是通过三联体结合分析和利用已知序列的多核苷酸得以阐明的

在没有 GTP(是蛋白质合成所必需的)存在的情况下，三核苷酸而不是二核苷酸，几乎和 mRNA 一样，能有效地促进核糖体与特定的 tRNA 结合。Nirenberg 和 Philip Leder 于 1964 年发现了这一现象，这使得各种密码子只需通过一个简单的结合分析即可被确认。核糖体及与其结合的 tRNA 可以一起被硝酸纤维素滤膜滞留，而自由的 tRNA 却不能。被结合的 tRNA 可以通过已接载了氨基酸的 tRNA 的混合物而得以确认。在混合物中，众多氨基酸残基中只有一种是被放射标记的。例如，UUU 被发现只能刺激核糖体和苯丙氨酸 tRNA 结合；同样地，UUG、UGU 和 GUU 分别刺激亮氨酸、半胱氨酸和缬氨酸 tRNA 的结合。因此，UUG、UGU 和 GUU 必然分别是编码亮氨酸、半胱氨酸和缬氨酸的密码子。用这种方法确认了大约 50 种编码氨基酸的密码子；剩余的密码子，它们的结合分析或是阴性的(没有 tRNA 结合)，或是模棱两可的。

848

遗传密码字典已经完成，而先前的结果也通过由 H. Gobind Khorana 化学合成具有特定重复序列的多核苷酸(这曾经是一项极费力的工作)得到了证实。例如，在一个无细胞翻译体系中，UCUCUCUC…被解读为：

UCU　CUC　UCU　CUC　UCU　C…

因而编码一条由两种氨基酸残基交替出现构成的多肽态。这种特殊的 mRNA 促使生成的产物为：

Ser-Leu-Ser-Leu-Ser-Leu…

因为 UCU 编码丝氨酸，而 UCU 编码亮氨酸。

3 种核苷酸交替出现的序列，如 poly(UAC)可编码 3 种不同的同聚多肽。因为核糖体可以在这些合成 mRNA 上，以 3 种可能的读框中的任何一种起始多肽的合成(图 26-2)。通过分析由各种两个和 3 个

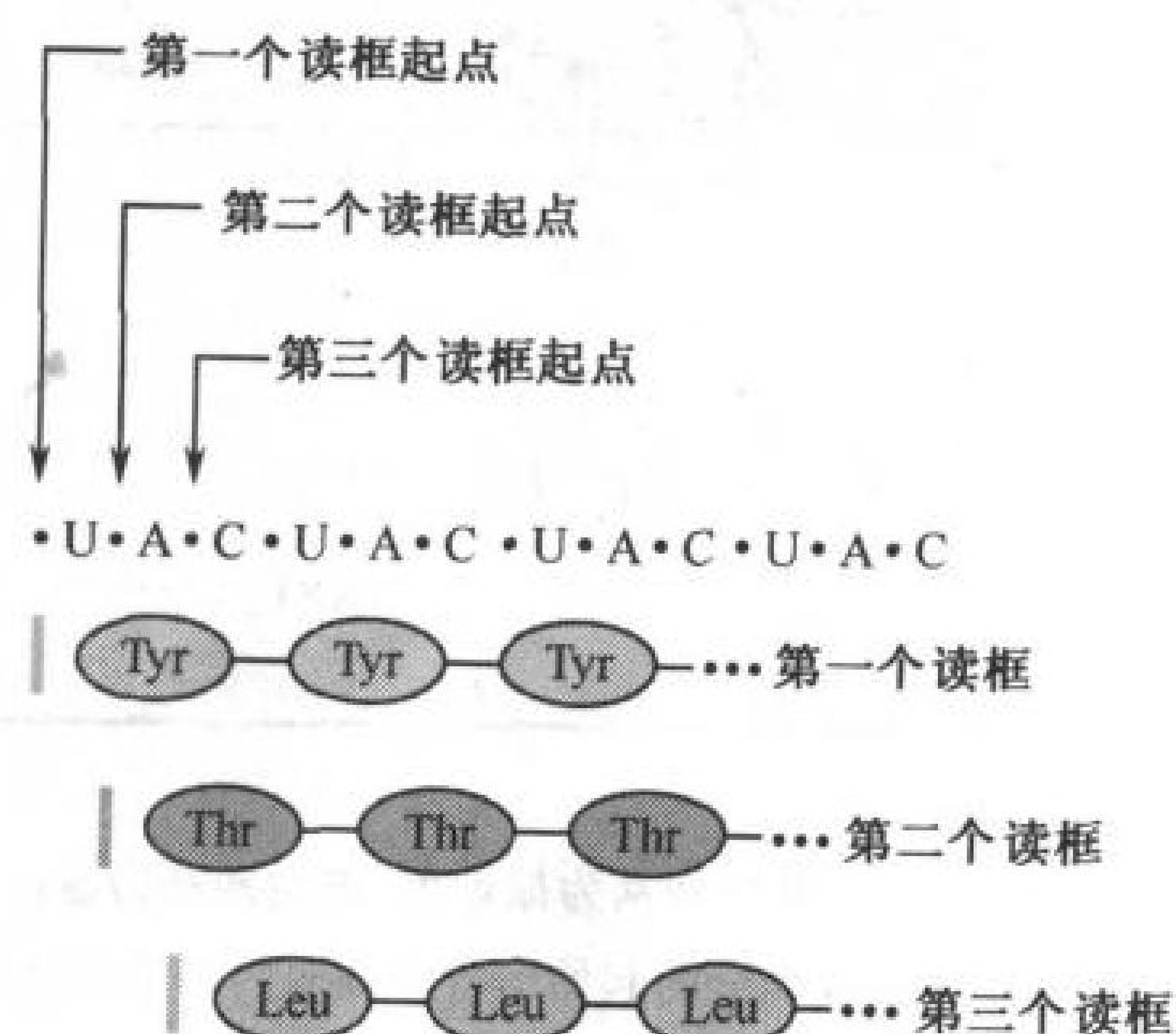


图 26-2　一个 mRNA 的 3 种可能的读框

每一种读框可以产生一种不同的多肽。

核苷酸的交替序列编码的多肽，确认了许多密码子的一致性并填补了遗漏的遗传密码。

C. 遗传密码的本质

遗传密码字典列于表 26-1。

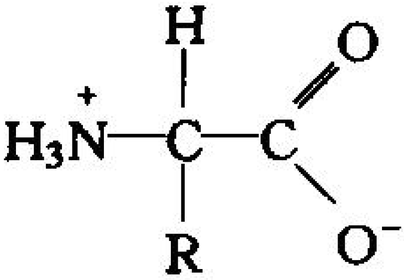


表 26-1　功能的秘诀："标准"遗传密码[a]

第1位（5′末端）	第2位 U	第2位 C	第2位 A	第2位 G	第3位（3′末端）
U	UUU Phe	UCU Ser	UAU Tyr	UGU Cys	U
U	UUC Phe	UCC Ser	UAC Tyr	UGC Cys	C
U	UUA Leu	UCA Ser	UAA STOP	UGA STOP	A
U	UUG Leu	UCG Ser	UAG STOP	UGG Trp	G
C	CUU Leu	CCU Pro	CAU His	CGU Arg	U
C	CUC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg	C
C	CUA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg	A
C	CUG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg	G
A	AUU Ile	ACU Thr	AAU Asn	AGU Ser	U
A	AUC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser	C
A	AUA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg	A
A	AUG Met[b]	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg	G
G	GUU Val	GCU Ala	GAU Asp	GGU Gly	U
G	GUC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly	C
G	GUA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly	A
G	GUG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly	G

[a] 非极性氨基酸残基为棕黄色，碱性残基为蓝色，酸性残基为红色，而极性无电荷残基为紫色。

[b] AUG 构成部分的起始信号并编码内部甲硫氨酸残基。

从表中可以看出，遗传密码具有一些显著特征：

1）密码的高度简并性

3种氨基酸——Arg、Leu和Ser——每种都是由6个不同的密码子所编码的，大多数其他氨基酸被4个、3个或2个密码子编码。只有Met和Trp两种在蛋白质中最不常见的氨基酸（表4-1）是由单个密码子编码的。编码同种氨基酸的密码子被称为**同义密码子**（synonym）。

框26-1 生物化学相关内容

遗传密码的进化

由于遗传密码的简并性，在密码子第3位上的点突变很少改变所编码的氨基酸。例如，一个GUU→GUA转换的密码子仍然编码缬氨酸，因而在表型上被称为是沉默的。其他点突变，即使在密码子的第1位或第2位，例如生成AUU(Ile)或GCU(Ala)，也只是导致化学上相近的氨基酸的替换，可能只对所编码的蛋白质的总体结构或功能产生最低限度的影响。这种内在的抗突变保护作用可能远非只是偶然形成的。

在60年代，对遗传密码的通用性的了解致使Francis Crick提出了“冻结偶然事故”理论。该理论认为，密码子完全是随机地分配给不同的氨基酸的。一旦分配好了，密码子的含义就不会改变了，因为不然极可能破坏所编码的蛋白质的结构。因而，一旦确定以后，遗传密码被认为就停止了进化。

然而，表26-1所列的密码子的分布，提示有另外一种遗传密码的进化史，原先的一些对应于少数氨基酸的简单密码子在这种进化过程中逐渐变得更为复杂。最早以RNA为基础的生命世界只有腺嘌呤核苷酸和尿嘧啶核苷酸。尿嘧啶几乎可以肯定是原始的碱基，因为嘧啶的生物合成途径，在产生胞嘧啶核苷酸或胸腺嘧啶核苷酸之前先生成尿嘧啶核苷酸（见节22-2）。当时可能需要腺嘌呤作为尿嘧啶的互补碱基。

假设最初建立的是一套基于三联体的遗传密码（很难想象有任何其他的安排可以造就当今的三联体密码），两种碱基已经可以编码$2^3=8$种氨基酸。事实上当今的遗传密码把这些全是U或A的密码子分配给了6种氨基酸和一个终止密码：

UUU = Phe　　AAA = Lys
UUA = Leu　　AAU = Asn
UAU = Tyr　　AUA = Ile
AUU = Ile　　UAA = Stop

AUA密码子最初很可能编码Met（现在由AUG编码），从而使可能的总数降为7种氨基酸。

当G和C出现在进化的生命形式中时，这些核苷酸掺入到RNA中。含有3种或4种碱基的密码子可以编码另外的氨基酸，但是由于对抗引入蛋白质中的破坏性突变的选择性压力，密码子的冗余度增加了。从表26-1可以看到，完全由G和C组成的三联体密码子只编码4种不同的氨基酸，这只有理论最大值8的一半：

GGG, GGC = Gly
GCG, GCC = Ala
CGG, CGC = Arg
CCC, CCG = Pro

这种密码子对氨基酸的非随机分配和遗传密码完全随机起源的说法发生了冲突。在只基于U和A的原始遗传密码中，逐步引入2个新的碱基（G和C），必然产生更大的信息容量（即编码20种氨基酸），同时将有害碱基取代率降到最小。

2)密码表的排列不是随机的

大多数同义密码子在表 26-1 中占据着相同的格子,即它们只在其第 3 位核苷酸有差别。XYU 和 XYC 总是编码相同的氨基酸;XYA 和 XYC 亦如此,但有两个例外。而且在密码子第一位上的改变倾向于编码相似的(如果不是相同的)氨基酸。而第二位是嘧啶的密码子大多数编码疏水性氨基酸(表 26-1 棕黄色部分)。那些第二位是嘌呤的大多编码极性氨基酸(表 26-1 蓝色、红色及紫色部分)。这些观察提示遗传密码的起源不是随机的,还表明密码的进化使得突变的有害作用降至最低(见框 26-1)。

3)UAG、UAA 和 UGA 是**终止密码子**(stop codon)

这 3 个密码子(也称**无义密码子**(nonsense codon))不编码氨基酸,但为核糖体终止多肽链的延伸提供信号。UAG、UAA 和 UGA 常常被称作琥珀型、赭石型和乳石型密码子(这些名字来源于一个实验室玩笑:琥珀的德语单词是 Bernstein,这是琥珀型突变发现者的名字。琥珀型突变使一些别的密码子转变成了 UAG,赭石和乳石是琥珀的双关语)。

4)AUG 和 GUG 是起始密码子

密码子 AUG 少数情况下是 GUG 编码多肽链合成的起始位点。然而它们也在多肽链的内部位置分别编码氨基酸 Met 和 Val。我们将在节 26-4A 中了解核糖体是如何区分这两类密码子的。

850

"标准"遗传密码不是通用的

很多年以来,人们认为"标准"遗传密码(表 26-1 所列)是通用的。这种假定部分是基于已有的观察,即一种生物(例如大肠杆菌)可以准确地翻译差异很大的生物(例如人类)的基因。确实,这种现象是基因工程的基础。然而 1981 年 DNA 的研究显示,*某些线粒体的遗传密码是"标准"遗传密码的变体*。例如,在哺乳类的线粒体中,AUA 和标准的 AUG 是 Met 的起始密码;UGA 不是编码"终止密码"而是 Trp;AGA 和 AGG 编码"终止密码"而不是 Arg。显然,含有自己的基因及蛋白质合成体系的线粒体和核基因组处于不同的进化选择压力之下。在有纤毛的原生动物中也有不同的遗传密码,这些原生动物很早就从真核生物的进化中分支出去了。因此,"标准的"遗传密码尽管被广泛采用,但不是通用的。

851

2. 转移 RNA 及其氨酰化

细胞必须把 RNA 碱基序列语言翻译成多肽语言,然而核酸并不特异性地和氨基酸结合。1955 年,Francis Crick 假设翻译是通过适配分子的中介发生的。这种分子携带了一个由酶促反应接载上的氨基酸,并可以识别相应的核酸密码子(图 26-3)。后来的实验表明,可溶性小分子 RNA 现在知道是 tRNA 扮演了适配子的角色。

A. tRNA 的结构

1965 年,Robert Holley 在经过 7 年的努力后,报道了第一个有重要生物学意义的核酸的碱基序列,那就是有 76 个残基的酵母**丙氨酸转移核糖核酸**($tRNA^{Ala}$)的序列。现在,数千种来源于数百种生物及细胞器的 tRNA 的碱基序列已经知道了(大多数是从其 DNA 序列得知的)。它们的长度变化范围在 60~95 个核苷酸(18~28kDa),而大多数有约 76 个核苷酸。

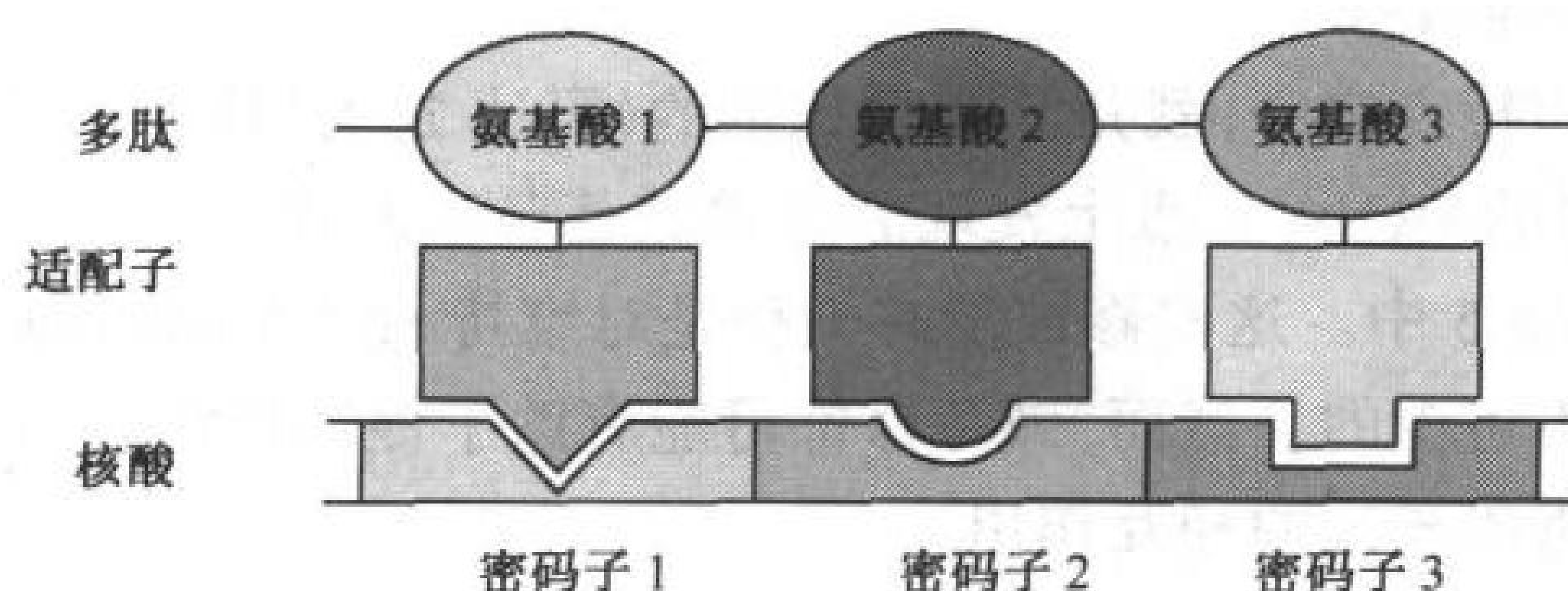


图 26-3　适配子假说
本假说认为遗传密码是由适配分子解读的，这些分子识别特定的密码子并携带相应的氨基酸。

几乎所有已知的 tRNA 可以画成所谓的三叶草形式的二级结构(图 26-4)，从 5′末端开始，它们具有以下共同特征。

1)一个 5′末端的磷酸基团。

2)一个 7 个碱基对的柄，包括 5′末端核苷酸以及可能含有非 Watson-Crick 配对的碱基对，如 G·U。这部分结构被称为**受体臂**或**氨基酸臂**，因为 tRNA 携带的氨基酸就悬挂在其 3′末端的羟基上。

3)一个由 3 或 4 个碱基对组成的柄，末端连着一个由 5～7 个碱基构成的环，这个环常常含有被修饰了的**二氢尿嘧啶**(dihydrouridine, D)碱基。因此，这个臂和环一起被称为 **D 臂**。

4)一个 5 个碱基对的臂，末端连着一个含有反密码子的环。这些特征性结构被称为**反密码子臂**(anticodon arm)。

5)5 个碱基对组成的臂，末端连着一个通常含有 TψC 序列(ψ 是假尿嘧啶的符号)的环。这部分结构叫做 **TψC** 或者 **T 臂**。

6)一段包含一个 3′末端自由羟基的 3′CCA 序列。CCA 序列或是遗传决定的，或是通过酶促反应连接到未成熟的 tRNA 上的，依物种而定(节 25-3C)。

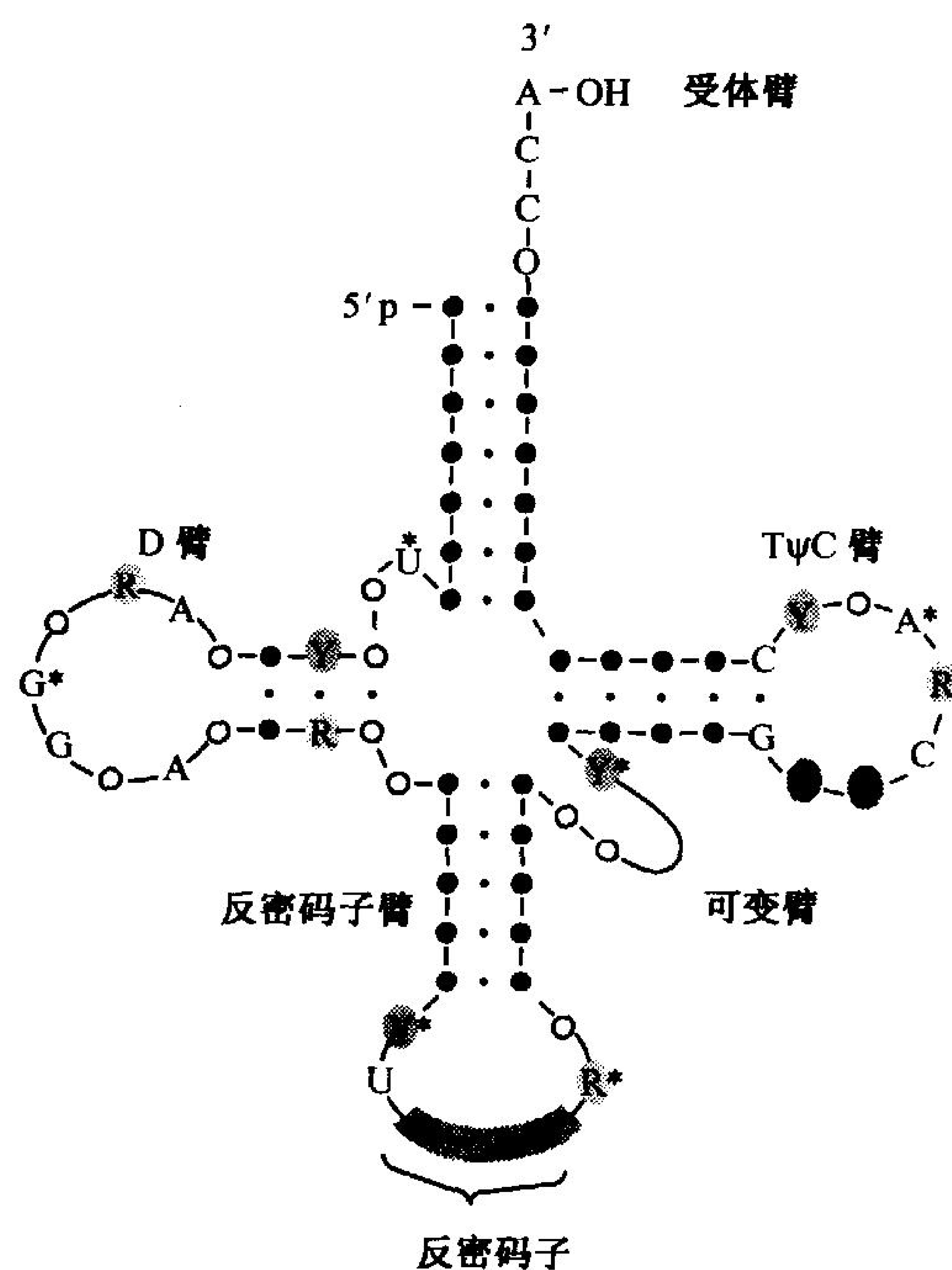


图 26-4　tRNA 的三叶草二级结构
由小点连接的实心圆圈代表 Watson-Crick 碱基对，空心圆圈表示非 Watson-Crick 配对的碱基。恒定位置的标识：R 和 Y 代表恒定的嘌呤和嘧啶，ψ 代表假尿嘧啶。带星号的核苷酸常常是被修饰的。D 及可变臂在不同的 tRNA 中含有不同数目的核苷酸。

tRNA 有 15 个恒定位置(总是含有相同的碱基)和 8 个半恒定位置(只能是嘌呤或者嘧啶)，这些位置大多出现在环状区域。反密码子 3′一侧的嘌呤总是被修饰了的。在已知的 tRNA 中变化最大的位点出现在所谓的**可变臂**(variable arm)内，它有 3～21 个核苷酸，可能有一个由至多 7 对碱基构成的臂。

tRNA 有为数众多的修饰碱基

tRNA 的最显著的特点之一，就是具有高比例的（可达 25%）被转录后修饰的碱基。大约有 80 种从多于 60 个不同的 tRNA 位点上发现的这类碱基已被研究过。其中的少数几个和它们的标准缩写一起列在图 26-5 中。这些修饰没有一种是对维持 tRNA 结构的完整性、或 tRNA 和核糖体的正确结合所必不可少的。然而，碱基修饰可能有助于促进氨基酸与受体臂的正确连接，或可以加强密码子和反密码子间的相互作用。

853

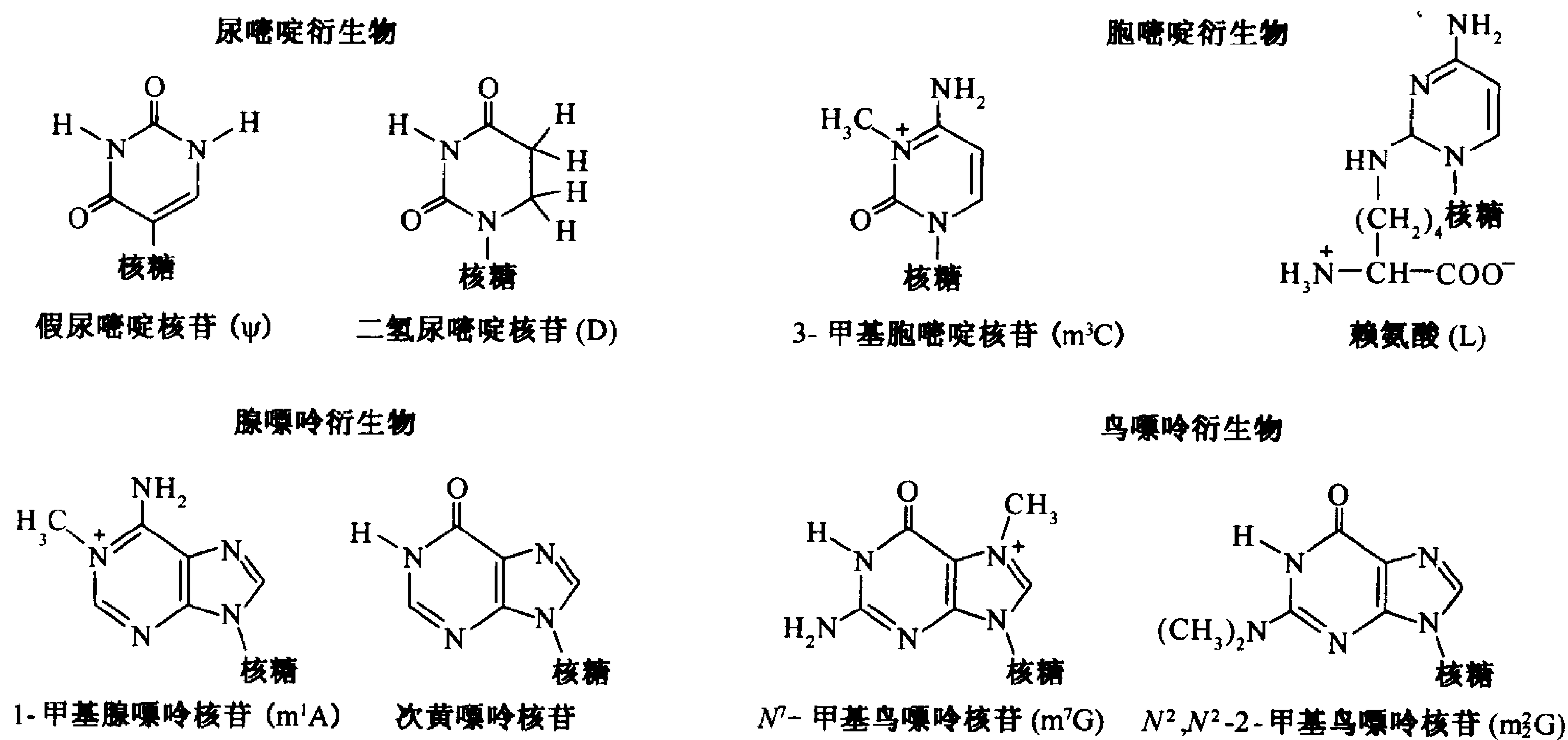


图 26-5　一些 tRNA 中出现的修饰核苷酸

注意，尽管在化学结构上类似于鸟苷，次黄嘌呤核苷在生化上是从腺苷衍生而来的。核苷也可能在核糖的 2′ 位被甲基化，形成用符号表示的残基，如 Cm、Gm、和 Um。

tRNA 的复杂三维结构

正如节 23-2E 所描述的，tRNA 呈 L 形，受体臂和 T 臂形成一条腿，而 D 臂和反密码子臂形成另一条腿（图 26-6）。L 形的每条腿约长 60Å，反密码子和氨基酸受体位点分别位于分子的相对的两个末端，相距约 76Å。tRNA 的 20～25Å 的狭窄的宽度对其生物功能是必要的：在蛋白质合成过程中，两个 tRNA 分子必须同时紧挨着结合在 mRNA 上两个邻近的密码子上（节 26-4B）。

tRNA 分子复杂的三维结构是靠广泛的相互堆集作用和螺旋柄内部及之间的碱基配对作用来维持的。例如，$tRNA^{Phe}$的结构包含有 9 个交互连接，除了其中之一以外全部是非 Watson-Crick 结合（图 26-7）。此外，涉及这些相互作用的碱基大多数是保守的或者是半保守的，这和所有 tRNA 都有类似构象的概念是一致的。一些不常见的氢键对 tRNA 的结构也有稳定作用，这些氢键有的是碱基之间形成的，有的是碱基和磷酸盐基团或核糖残基的 2′-OH 之间形成的。

854

酵母 $tRNA^{Phe}$的紧密结构使其大多数碱基不能接触到溶剂。最显著的例子是反密码子的碱基以及那些携带氨基酸的—CCA 末端的碱基，这两组碱基必须是溶剂可及的，以利于行使其生物功能。

B. 氨酰-tRNA 合成酶

准确的翻译需要两个同样重要的识别步骤：

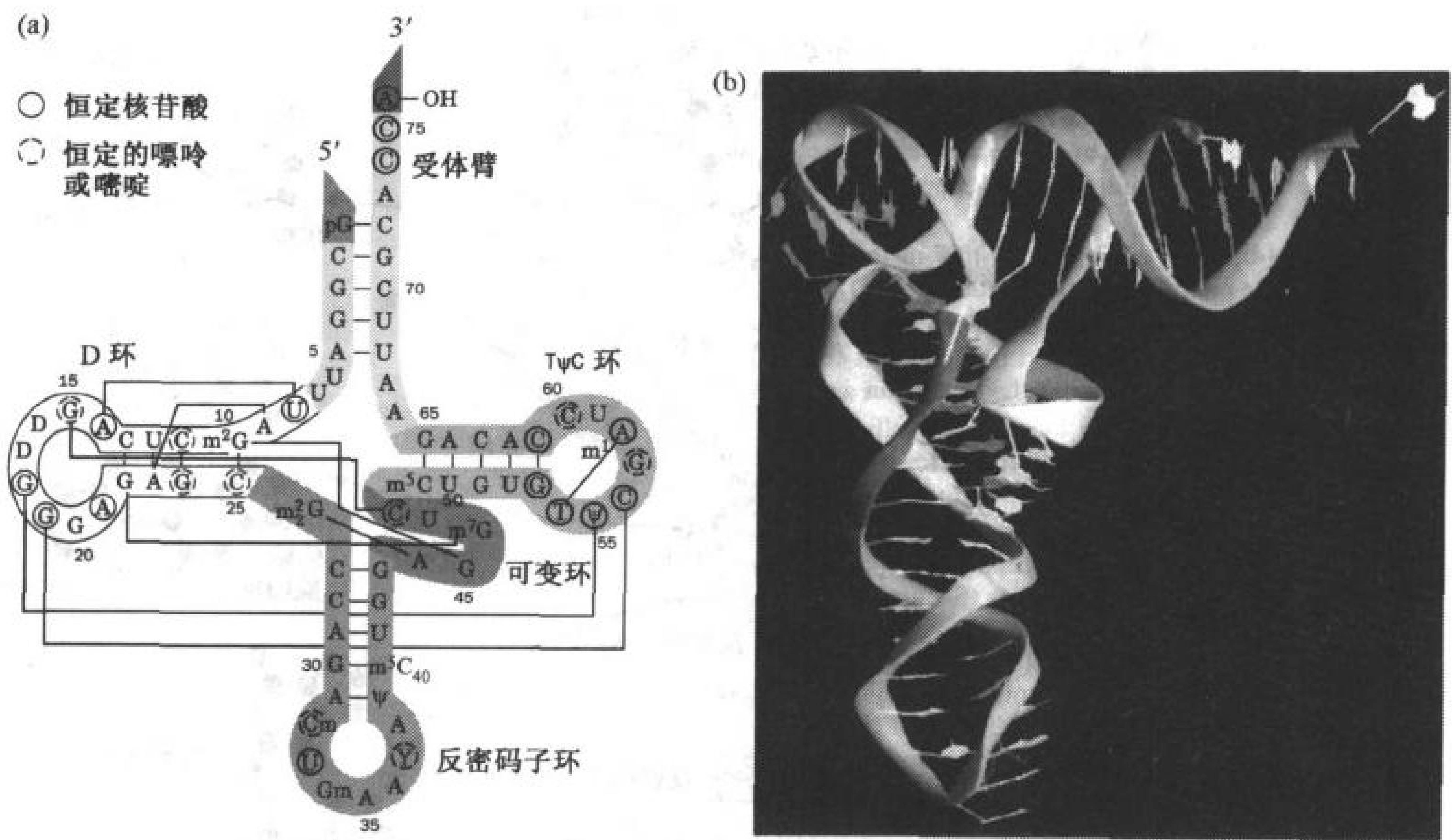


图 26-6　*结构的秘诀*：酵母 tRNA[Phe] 的结构

(a)按三叶草形状绘制的碱基序列。三维碱基配对的相互作用由连接所参与的碱基的细红线表示。在所有的 tRNA 中都保守的或半保守的碱基分别被实线和断线圈起来。5′末端是鲜绿色的，受体臂是黄色的，D 臂是白色的，反密码子臂是淡绿色的，可变臂是橘黄色的，TψC 臂是蓝青色的，3′末端是红色的。(b)X 射线结构图，显示 tRNA 碱基配对的柄是如何排列成 L 形的分子的。糖-磷酸盐主干由飘带状表示，其颜色系统和(a)中一致。(引自 Mike Carson, University Of Alabama Of Birmingham)

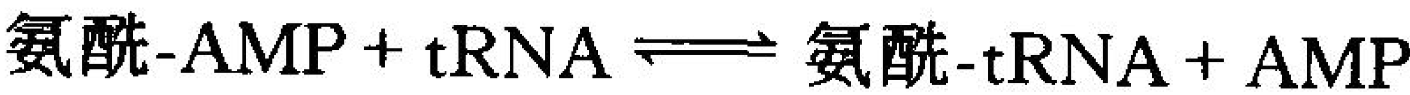
1)正确的氨基酸必须由**氨酰- tRNA 合成酶**选择，共价连接到 tRNA 上(讨论见后)；

2)正确的**氨酰-tRNA** 必须在核糖体上与 mRNA 的密码子配对(在节 26-4D 讨论)。

氨基酸专一的氨酰-tRNA 合成酶(**aaRS**)把氨基酸添加到其相关的 tRNA 3′末端的核糖残基上，形成氨酰-tRNA(图 26-8)。氨酰化是在同一种酶的催化下经过两步连续反应实现的。

1)首先氨基酸与 ATP 反应被活化，形成**氨酰-腺苷酸**。除了 3 种之外，所有 aaRS 都可以在没有 tRNA 存在的情况下催化这一反应。事实上这种中间产物是可以被分离的，尽管它通常保持与酶紧密的结合。

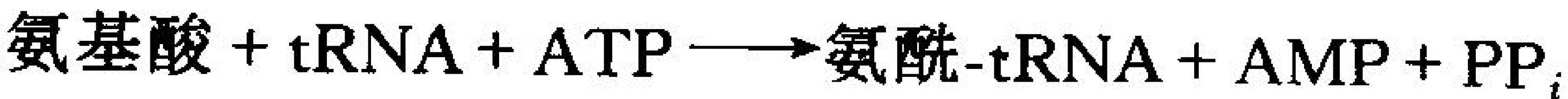
2)然后这种混合酐与 tRNA 反应生成氨酰-tRNA：



$$\text{氨酰-AMP} + \text{tRNA} \rightleftharpoons \text{氨酰-tRNA} + \text{AMP}$$

有些 aaRS 只能把氨基酸加到其对应的 tRNA 末端 2′羟基上，而另一些则只能把氨基酸加到 3′羟基上。这种选择性是通过采用化学修饰 tRNA 的方法实现的，被修饰的 tRNA 3′末端的核糖残基或缺乏 2′羟基或缺乏 3′羟基。采用这些衍生物是必然的，因为在溶液中氨酰基在 2′和 3′位之间存在快速的平衡反应。

整个氨酰化反应



$$\text{氨基酸} + \text{tRNA} + \text{ATP} \longrightarrow \text{氨酰-tRNA} + \text{AMP} + \text{PP}_i$$

是在第一步反应所产生的焦磷酸的水解作用的推动下完成的。氨酰-tRNA 产物是一种“高能”化合物(节 13-2A)，正因为如此，氨基酸称为被“活化”，而 tRNA 称为被“装载”。氨基酸活化类

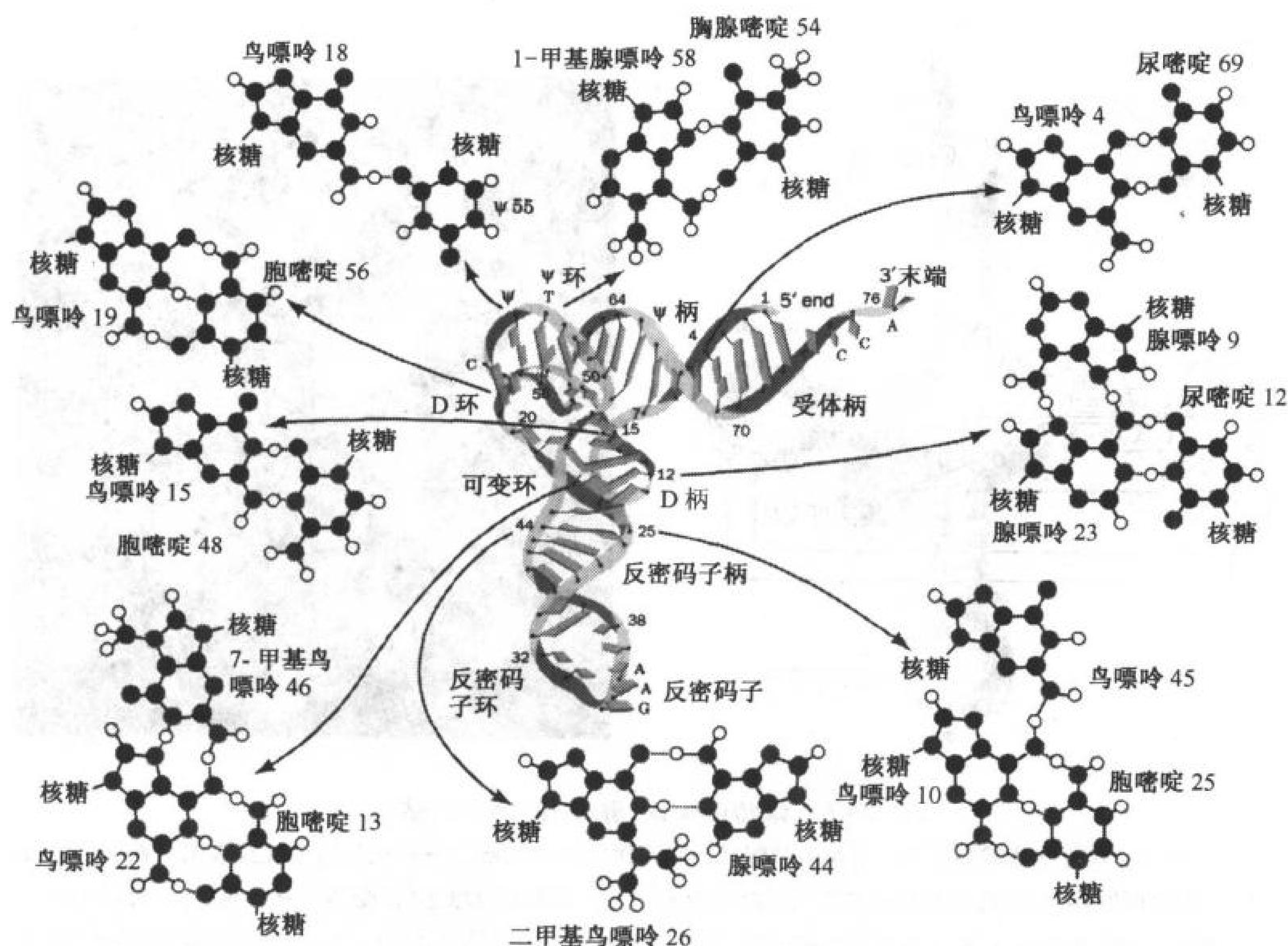


图 26-7 酵母 $tRNA^{Phe}$中的 9 种三维碱基配对作用

注意,除了一种以外,所有都包含非 Watson-Crick 配对,它们都位于 L 的转角部位。[引自 Kim, S. H., in Schimmel, P. R., Söll, D., and ABelson, J. N. (Eds.), Transfer RNA: Structure, Properties and Recognition, p.87, Cold Spring HarBor Laboratory (1979). Drawing of tRNA copyrighted©by Irving Geis]

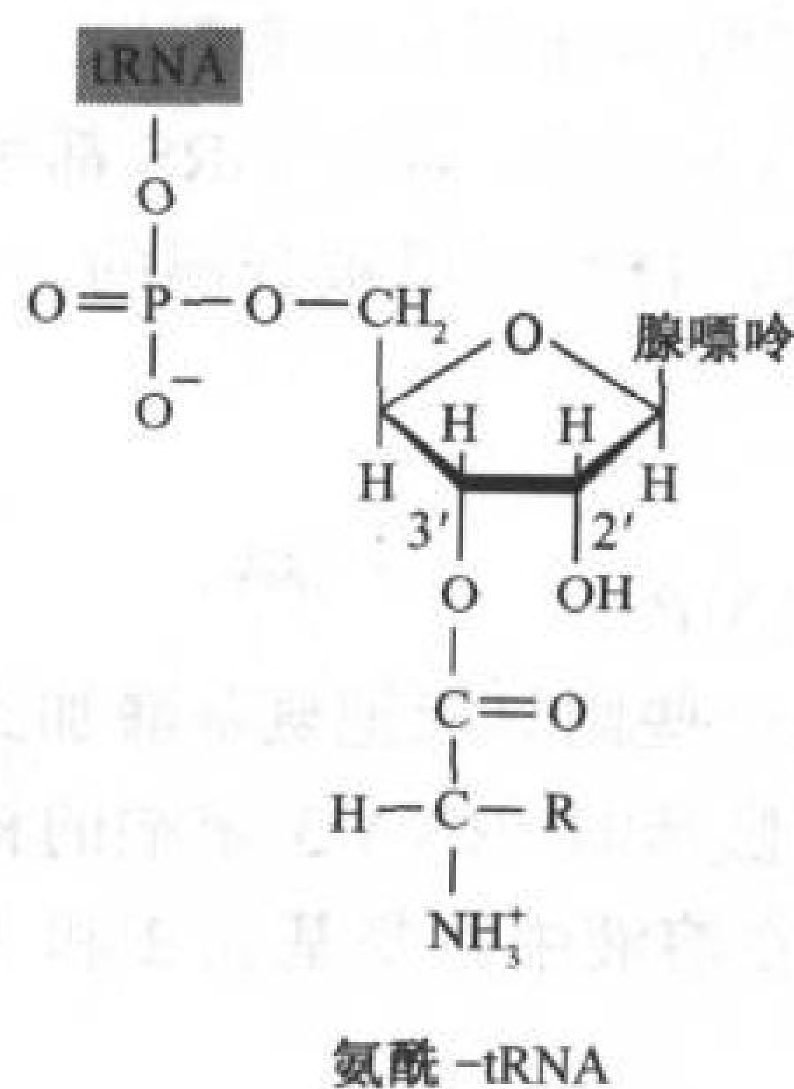
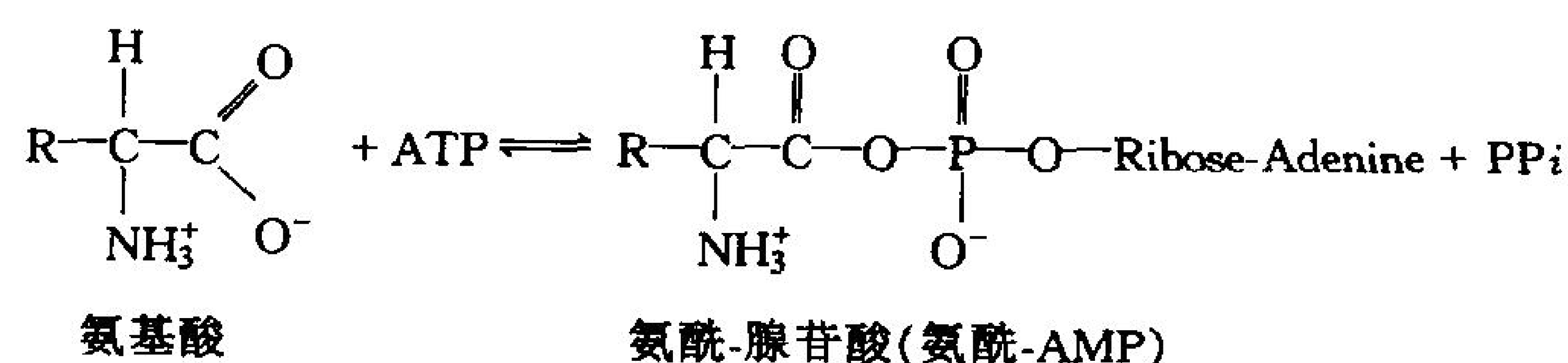


图 26-8 氨酰-tRNA

氨基酸残基酯化在 tRNA 3′末端核苷酸的 3′或 2′羟基上。这里是在 3′羟基上。

同于脂肪酸活化(节 9-2A);主要的差别在于氨基酸活化中 tRNA 是酰基的受体而在脂肪酸活化中由辅酶行使这样的功能。



两类氨酰-tRNA 合成酶

对 20 种氨基酸中的每一种,细胞必需至少有一种 aaRS 与之对应。这些酶所催化的反应的相似性,以及 tRNA 之间的结构相似性提示,所有 aaRS 是从同一个祖先进化来的,因而在结构上应该是相关的。但情况并非如此。事实上,aaRS 构成了若干不同的酶类,它们有不同的大小

和四级结构，在序列上也没有多少相似性。然而，这些酶还是可以分成两大类，在所有生物中每类酶都有同样的10个成员(表26-2)。

表26-2 大肠杆菌氨酰-tRNA合成酶的分类

	氨基酸	四级结构	残基数目
I类	Arg	α	577
	Cys	α	461
	Gln	α	551
	Glu	α	471
	Ile	α	939
	Leu	α	860
	Met	α_2	676
	Trp	α_2	325
	Tyr	α_2	424
	Val	α	951
II类	Ala	α_4	875
	Asn	α_2	467
	Asp	α_2	590
	Gly	$\alpha_2\beta_2$	303/689
	His	α_2	424
	Lys	α_2	505
	Pro	α_2	572
	Phe	$\alpha_2\beta_2$	327/795
	Ser	α_2	430
	Thr	α_2	642

引自：Carter, C. W., Jr., Annu. Rev. Biochem. 62, 717(1993).

I类和II类氨酰-tRNA合成酶有几方面的差别：

1)**结构模体**

I类酶共享两个同源肽段，其保守序列为His-Ile-Gly-His(HIGH)和Lys-Met-Ser-Lys-Ser(KMSKS)。这两个肽段都是二核苷酸结合折叠(Rossmann折叠，也存在于许多NAD^+和ATP结合蛋白中，节6-2B)的组分。II类酶缺乏上述序列，但具有其他3种共同序列。这些序列存在于只有II类酶才具有的模体中，由一个七股反平行β折叠和3个侧翼的螺旋构成，形成了其催化结构域的核心。

2)**反密码子的识别**

许多I类aaRS必须识别反密码子，以使其对应tRNA氨酰基化。相反，一些II类酶并不与结合的tRNA的反密码子互相作用。

3)**氨酰化位点**

所有I类酶氨酰化它们结合的tRNA 3′端的2′羟基，而II类酶使3′羟基氨酰化。然而，2′位点上的氨酰基迅速在2′和3′位之间建立起平衡(参与蛋白质合成的氨酰基必须在3′位)。

4)氨基酸的专一性

和 II 类合成酶相比,I 类合成酶倾向于专一作用于较大而且疏水性较强的氨基酸。

856

氨酰-tRNA 合成酶识别 tRNA 的独特的结构特征

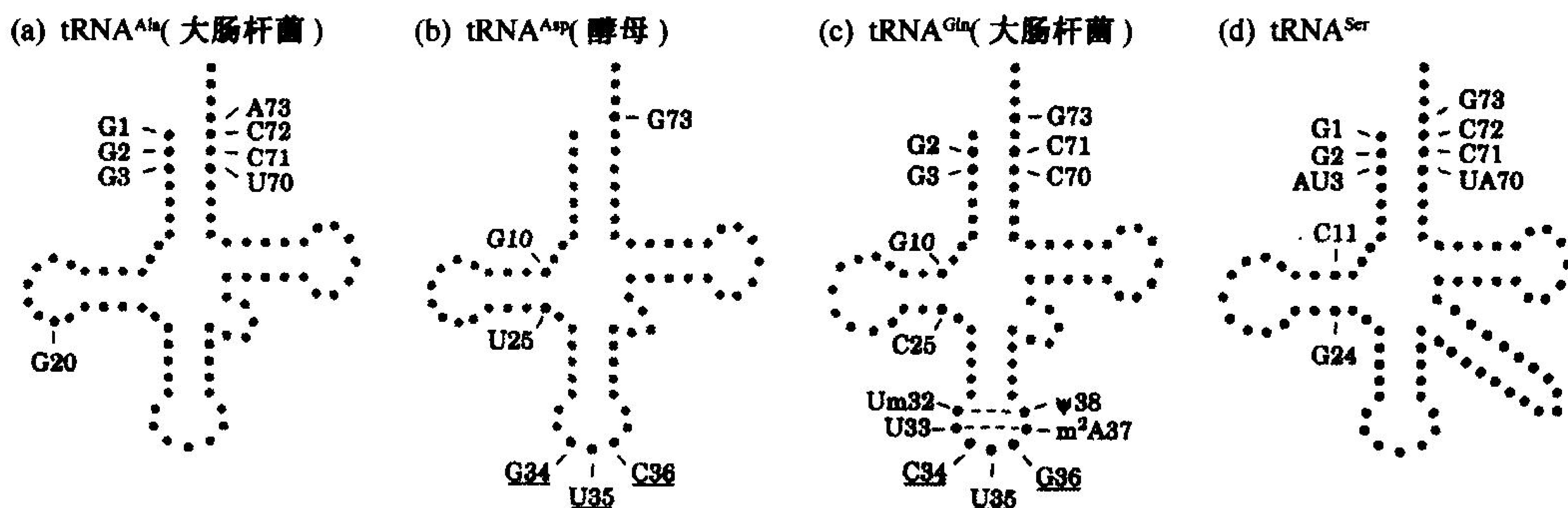


图 26-9　4 种 tRNA 的主要特征元件

tRNA 中的每个碱基由实心圆圈代表。红圆圈表示对应的氨酰-tRNA 合成酶识别的 tRNA 的特征元件所在的位置。属于特征元件的反密码子碱基用下划线表示。

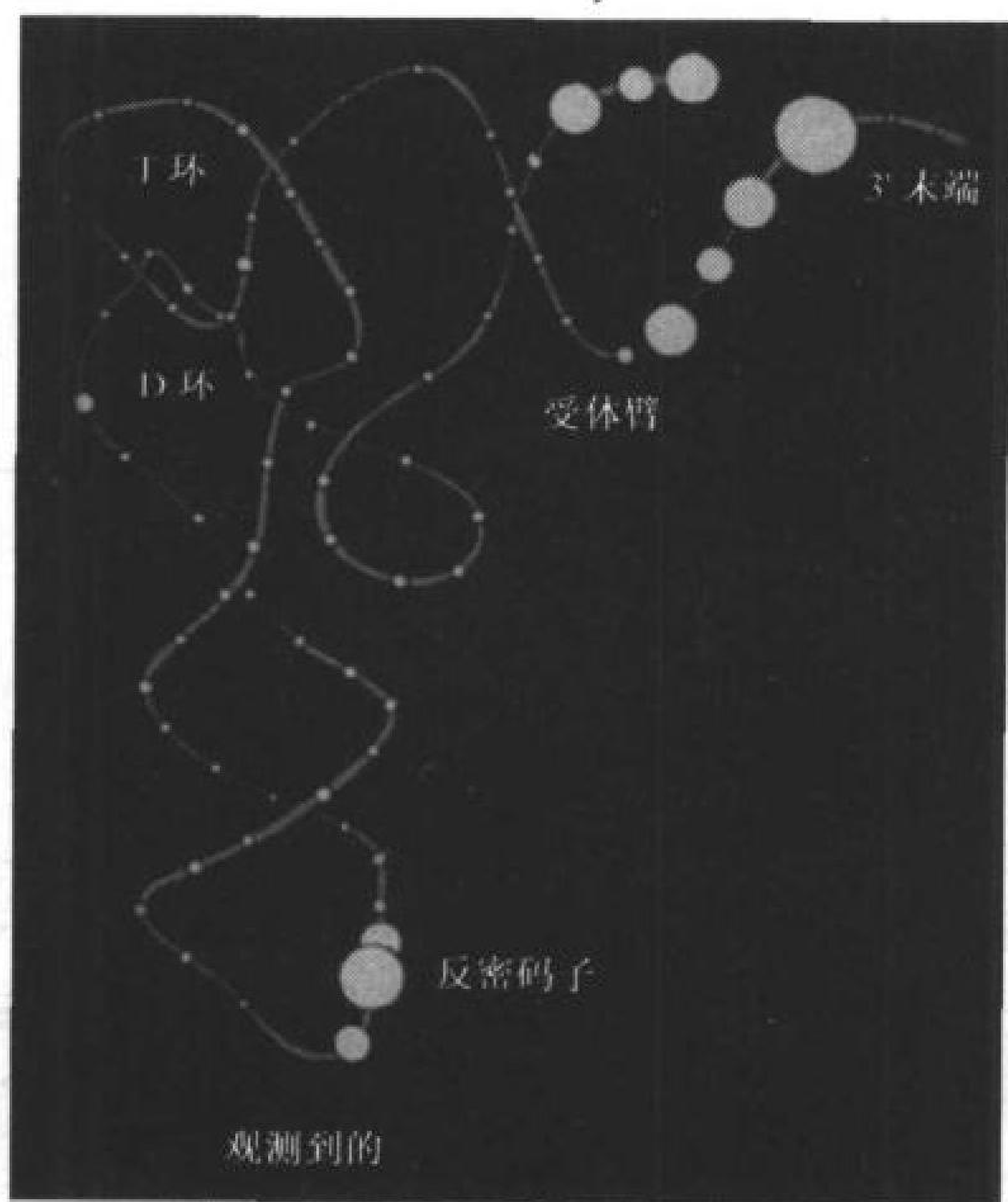


图 26-10　实验观测到的 tRNA 的特征元件

tRNA 的骨架为蓝色,每个核苷酸用黄色圆圈表示,其直径与 20 种 tRNA 受体类型的组分是成正比的。对这些 tRNA 受体而言,核苷酸是观测的决定因素。(引自 William H. McClain, University of Wisconsin)

aaRS 是如何识别 tRNA 从而使其可以装载上正确的氨基酸的呢?首先,由于所有的 tRNA 都具有相似的结构,因此,用以区分它们的特征必然是序列上或是局部结构上的微妙变化。另一方面,由于遗传密码的简并性,多种 tRNA 可能携带同一种氨基酸。这些所谓的**同功 tRNA**(isoaccepting tRNA)必然是被其对应的 aaRS 所识别。最后,tRNA 只能被装载上与其反密码子相对应的氨基酸,而不能是其他 19 种氨基酸中的任何一种。通过对 tRNA 片段、突变改变的 tRNA、化学交联剂、计算机化的序列比较以及 X 射线晶体学等研究已经收集了一些有关合成酶和 tRNA 相互作用的专一性的线索。tRNA 上最通常的合成酶接触位点位于 L 的内(凹)面上。除此之外,几乎没有什么规律可以确定 tRNA 是如何被其对应合成酶识别的。

tRNA 被不同 aaRS 所识别的 4 种元件如图 26-9 所示。在所有这些例子中,受体臂是酶-tRNA相互作用至关重要的,其他位点也一样,但不一定包括反密码子。单个碱基或碱基对可能构成一个特征元件。当把实验所确定的各种 tRNA 的特征元件绘制在一张 tRNA 分子的三维模式图上时,它们成串聚集在受体臂和反密码子环上(图 26-10)。这些位点位于分子的相反的末端,因而与两者作用的 aaRS 必须有适当的

大小和结构，以便与 L 形 tRNA 的两条腿结合。

合成酶-tRNA 复合体的 X 射线结构显示，蛋白质和 tRNA 在 L 形的内表面有广泛的接触。由 Thomas Steitz 测定的大肠杆菌**谷氨酰-tRNA 合成酶**(GlnRS)和 **$tRNA^{Gln}$**及 ATP 形成的复合体是第一个被阐明的结构(图 26-11)。GlnRS 是一个有 553 个残基的单体 I 类酶，它呈细长形状，因而它在靠近蛋白质的一端与反密码子结合，而在另一端与受体臂结合。遗传学和生化数据表明，$tRNA^{Gln}$的特征元件包含了反密码子环的所有 7 个碱基(图 26-9c)。反密码子本身的碱基并不堆集在一起，而是向外伸展，从而和 GlnRS 的单独的识别口袋结合。$tRNA^{Gln}$的 3′末端深深地探入蛋白质口袋中，口袋内还结合酶的 ATP 和谷氨酰胺底物。

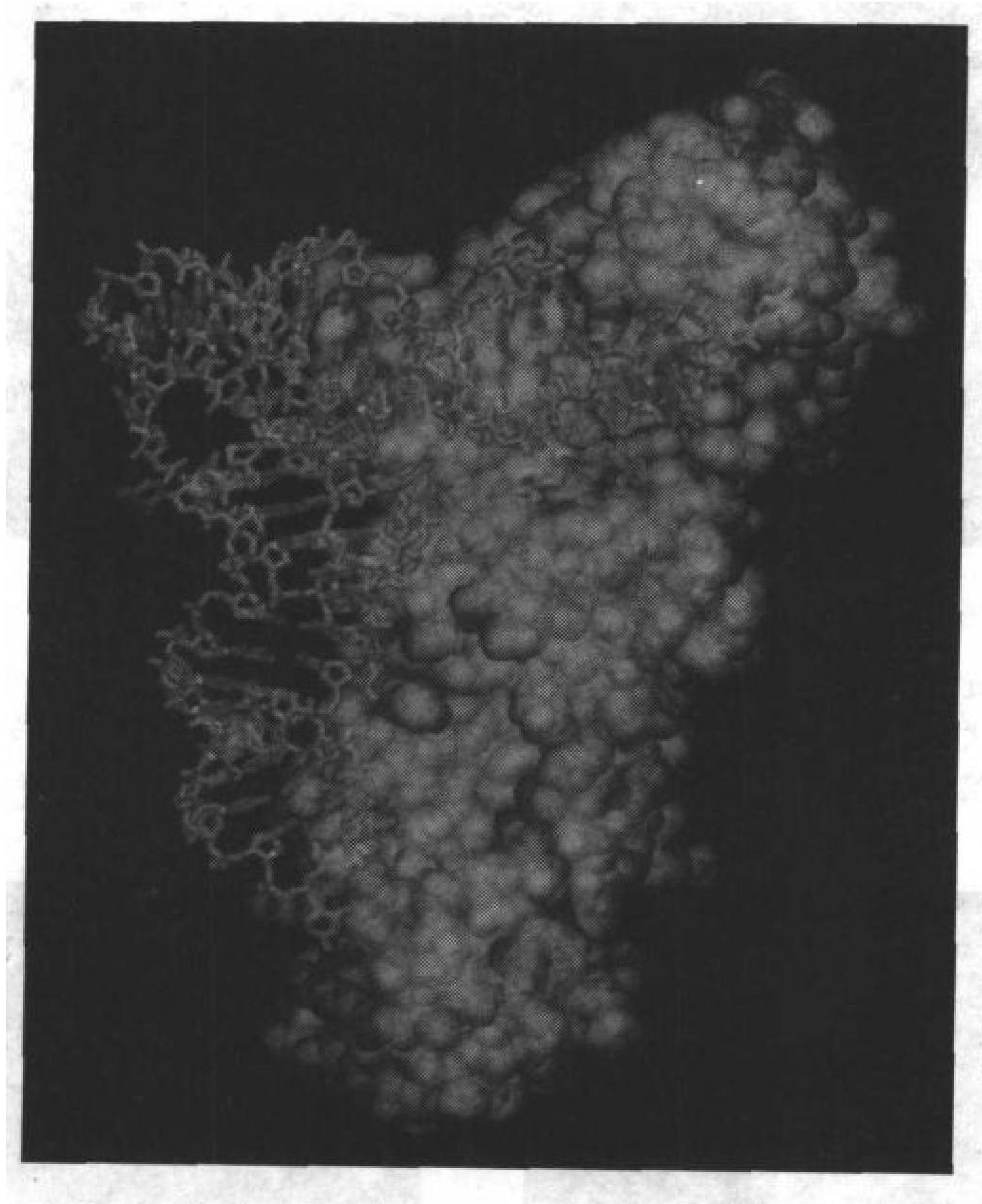


图 26-11 大肠杆菌 GlnRS · $tRNA^{Gln}$· ATP 的 X 射线结构

tRNA 和 ATP 以骨架形表示。tRNA 的糖-磷酸主干为绿色，其碱基为紫红色，ATP 为红色。蛋白质用半透明的蓝绿色空间充实模型表示，显示出 tRNA 和 ATP 被掩蔽了的部分。注意，tRNA 的 3′末端(右上)及其反密码子碱基(底部)均插入到蛋白质中很深的口袋内。(基于 Thomas Steitz, Yale University 的 X 射线结构)

酵母 **AspRS** 是一个 II 类酶，是一个由 557 个残基的亚基构成的 α_2 二聚体。Dino Moras 测定的该酶与 **$tRNA^{Asp}$**形成的复合物的 X 射线结构显示，蛋白质主要通过与受体臂和反密码子区接触，对称性地结合了两个 tRNA 分子(图 26-12)。相对于未形成复合体的 $tRNA^{Asp}$的反密码子臂的 X 射线结构，复合体中的 $tRNA^{Asp}$的反密码子臂朝 L 形的内侧面，弯曲程度达 20Å，其反密码子的碱基未堆集在一起。这个弯曲的关节点是反密码子臂中的 G30 · U40(几乎所有其他物种的 tRNA 在这个点上都会有一对 Watson-Crick 碱基对)。和 GlnRS 接触的 $tRNA^{Gln}$的反密码子

857

碱基也未堆集，但其主干的构象和 tRNA^{Asp}不同。显然，tRNA 在与其对应的合成酶的复合体中

858

的构象更多地是取决于它和酶的相互作用（诱导楔合）而不是其序列。这可能是为什么一个细胞中的每组同工 tRNA 的成员由同一个 aaRS 识别的一个原因。

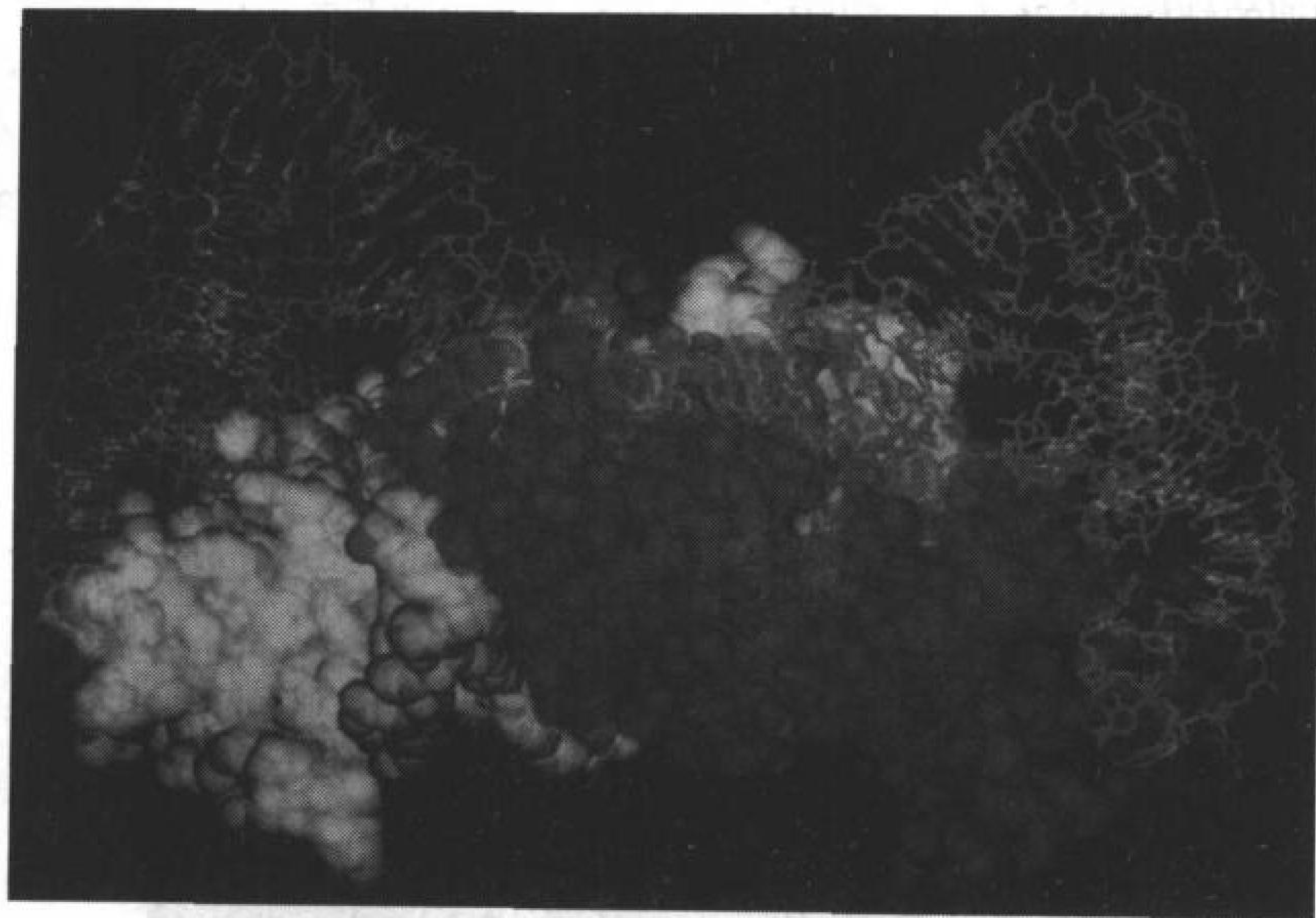
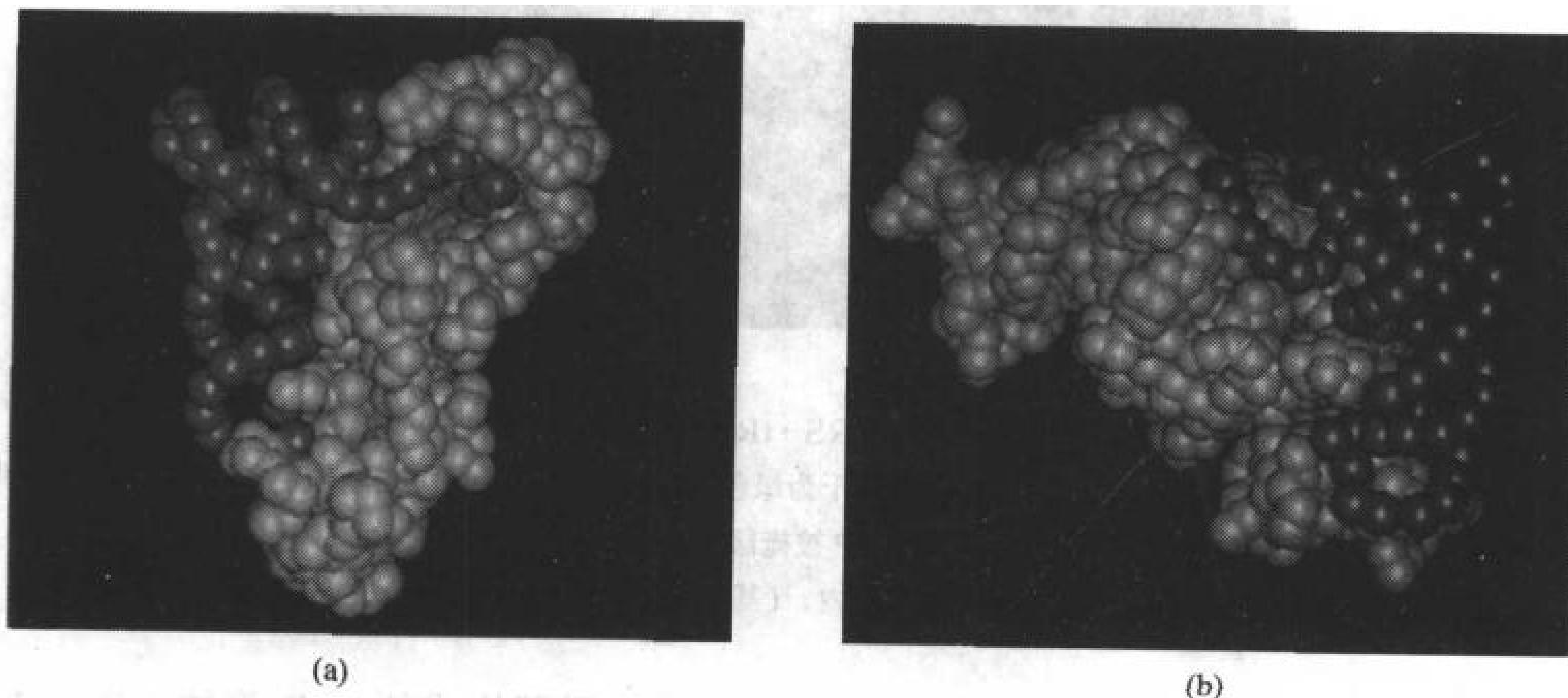


图 26-12 酵母 AspRS·tRNA^{Asp}·ATP 的 X 射线结构

从复合体近乎垂直的二重对称轴观察酶的同源二聚体及其对称结合的两个 tRNA 分子。tRNA 用骨架形式表示，其糖-磷酸主干为绿色，碱基为紫红色。两个蛋白亚基用半透明的黄色及蓝色空间充实模型表示，显示出 tRNA 被掩蔽了的部分。（Dino Moras, Institut de Biolgie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, Strasbourg, France 的 X 射线结构）



(a) (b)

图 26-13 GlnRS 和 AspRS 与其相应的 tRNA 结合的比较

蛋白质和 tRNA 用蓝色和红色的球表示，这些球标志 C_α 和 P 原子的位置。(a)显示 I 类合成酶 GlnRS 是如何从 tRNA^{Gln}受体臂的小沟一侧与其结合，使其 3′末端弯曲成一个发夹形的构象。(b)相反，II 类合成酶 AspRS 从 tRNA^{Asp}受体臂的大沟一侧与其结合，结果其 3′末端继续以其螺旋形轨迹进入活性中心。（引自 Dino Moras, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire du CNRS, Strasbourg, France）

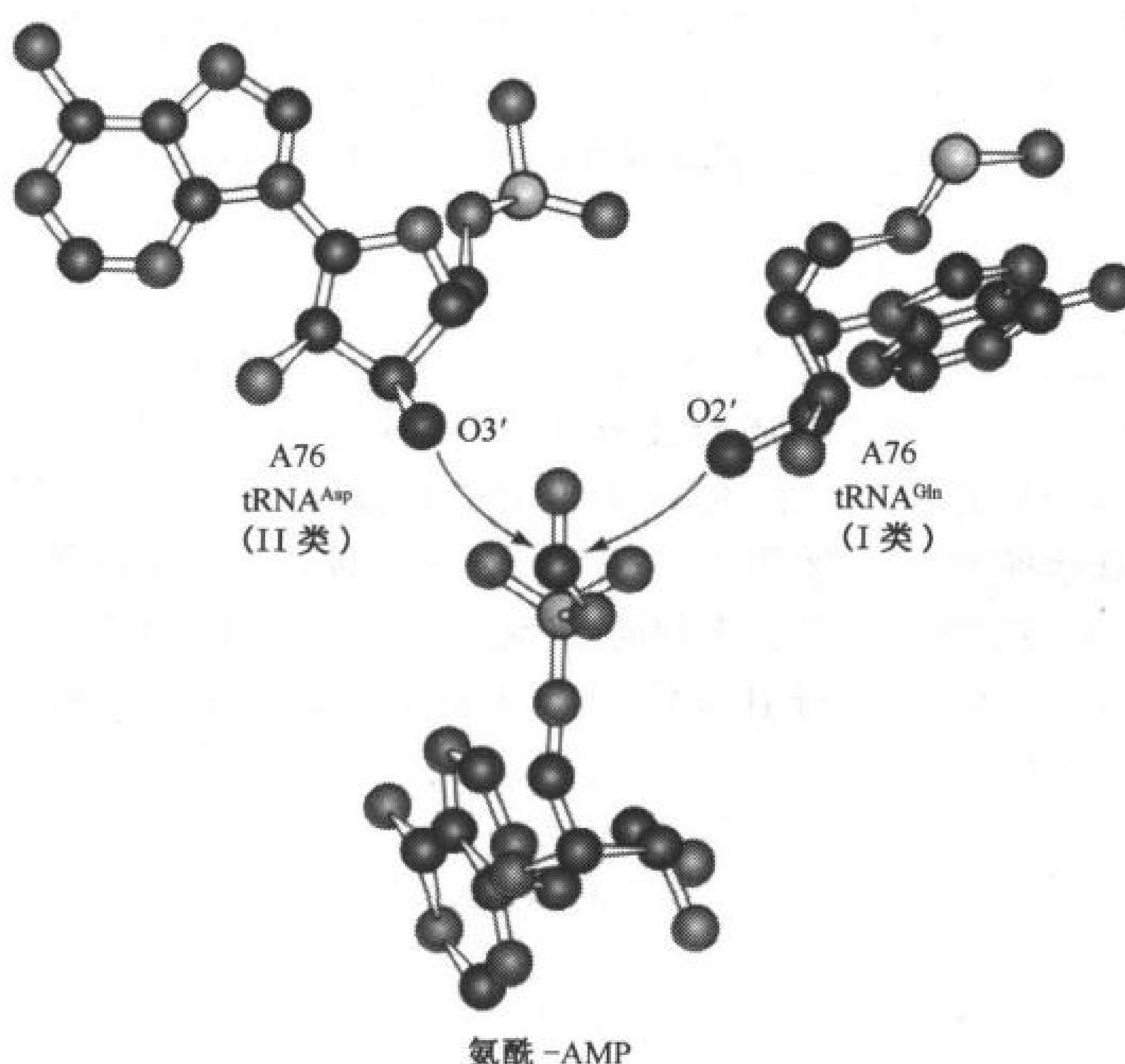


图 26-14　I 类和 II 类合成酶催化氨酰化的立体化学比较

对 GlnRS(I 类)而言,酶结合的 tRNA 的 3′末端腺苷残基(A76)位于氨酰-AMP(这里氨酰基只以其羰基代表)的右侧,对 AspSR(II 类)而言,位于氨酰-AMP 的左侧。注意,只有 $tRNA^{Gln}$的 O3′原子和 $tRNA^{Asp}$的 O2′原子处于合适的位置可被攻击,从而把氨酰残基转移到 tRNA 上。[引自 Cavarelli, J., Eriani, G., Rees, B., Ruff, M., Boeglin, M., Mitschler, A., Martin, F., Gangloff, J., Thierry, J.-C., and Moras, D., EMBO J. 13, 335(1994)]

tRNA 被 GlnRS 和 AspRS 结合的不同形式显示于图 26-13。尽管两种 tRNA 都是沿其 L 形的内侧面和它们的合成酶接近,但 $tRNA^{Gln}$是从其受体臂小沟的方向接近,而 $tRNA^{Asp}$则是从其大沟方向接近的。因此,$tRNA^{Asp}$的 3′端继续以其螺旋形的轨迹插入 AspRS 的活性中心,而 $tRNA^{Gln}$在进入活性位点时,其 3′末端向后弯成发夹转角。这些结构上的差别说明了 I 类和 II 类酶催化 tRNA 的 3′末端核糖不同羟基氨酰化的原因(图 26-14)。

校对提高了氨基酸和 tRNA 连接的保真度

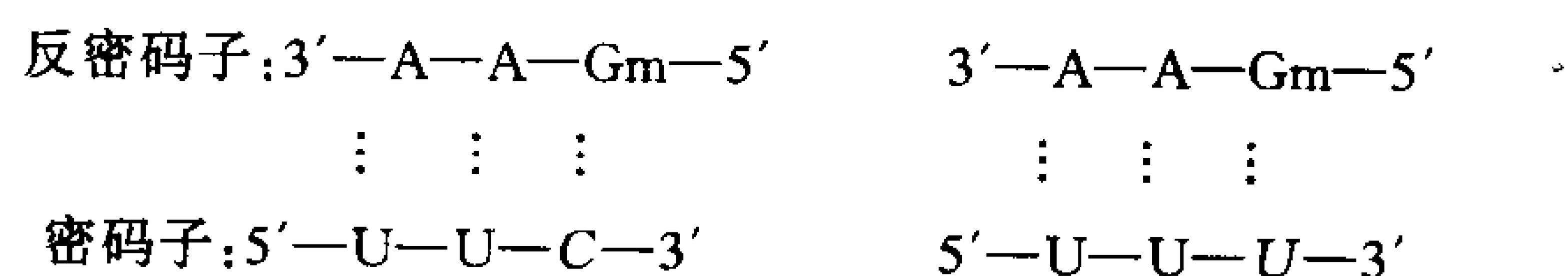
tRNA 接载与其对应的氨基酸是一个非常精确的过程。例如,实验测定表明,在相同的异亮氨酸和缬氨酸浓度下,IleRS 转移约 50 000 个异亮氨酸给 $tRNA^{Ile}$,只转一个缬氨酸给 $tRNA^{Ile}$。这种高精确度是惊人的,因为缬氨酸和异亮氨酸的差别只是缺少了一个亚甲基,它本应该很容易和 IleRS 的异亮氨酸结合位点匹配。考虑到一个亚甲基据估计可能提供约 $12kJ.mol^{-1}$的额外的结合自由能,这提示异亮氨酰-tRNA 合成酶应该以一个大约不大于 100 的因子来区分异亮氨酸和缬氨酸之间的差别。

Paul Berg 解释了这种明显自相矛盾的现象。他证明,在 $tRNA^{Ile}$存在的情况下,IleRS 定量催化氨酰化反应的中间产物——缬氨酸-腺苷酸——水解生成缬氨酸 + AMP,而不是 Val-$tRNA^{Ile}$。这样,*异亮氨酰-tRNA 合成酶将氨酰基-腺苷酸置于一种校对或编辑步骤*,这一过程使人联想到 DNA 聚合酶 I 行使的校对作用(节 24-2A)。校对发生在一个单独的活性位点,据推测该位点和缬氨酸结

合而把较大的异亮氨酸排除在外。酶的总体选择性是对腺苷化的选择性和校对步骤的结果，因而为翻译提供了很高的保真度。许多其他的合成酶以类似的方式来区分非对应的氨基酸。注意，编辑的发生是以水解 ATP 为代价的，这是高保真度（增加有序性）的热动力学代价。

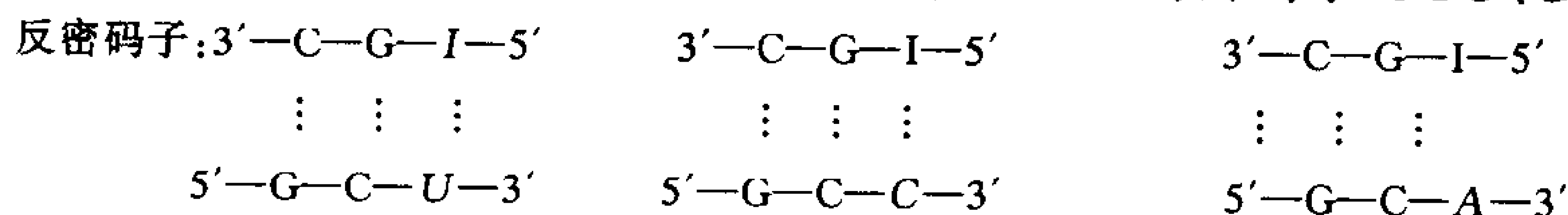
C. 密码子-反密码子的相互作用

在蛋白质合成时，正确的 tRNA 只是通过密码子-反密码子的相互作用来选择的，氨酰基并不参与此过程（这就是为什么对蛋白质合成来说正确的氨酰化是至关重要的一个原因）。一个 mRNA 的密码子的 3 个核苷酸与一个 tRNA 的互补的反密码子的 3 个核苷酸以反平行的方式配对。有人可能会天真地推测 61 个密码子中每个指定氨基酸的密码子都被一个不同的 tRNA 解读。然而，尽管大多数细胞含有为数众多的同功 tRNA 群，许多 tRNA 与 2 个或者 3 个指定其对应氨基酸的密码子结合。例如，酵母 $tRNA^{Phe}$ 有反密码子 GmAA（Gm 表示 G 有一个 2′甲基），可以识别密码子 UUC 和 UUU，



860

而酵母 $tRNA^{Ala}$ 有反密码子 IGC（I 是次黄嘌呤），可以识别密码子 GCU、GCC 和 GCA。



由此看来，非 Watson-Crick 碱基配对可以发生在密码子-反密码子的第三位（反密码子的第 1 位被定义为它的 3′核苷酸），这是大多数密码子的简并位点（表 26-1）。注意，在反密码子的第 3 位（5′）通常含有修饰碱基，如 Gm 或 I。

摆动假说对密码子简并性的解释

结合对结构的了解和逻辑推理，Crick 提出了**摆动假说**（wobble hypothesis）来解释一个 tRNA 如何识别几种简并密码子。他假定前两个密码子-反密码子配对具有正常的 Waston-Crick 几何学，同时在第 3 个反密码子位置可存在少量的活动或“摆动”，允许在配对几何学上作有限的构象调整。这就使得一些非 Watson-Crick 配对得以形成，例如 U·G 以及 I·A（图 26-15）。在密码子-反密码子第 3 位允许形成的配对列在表 26-3 中。第 3 位是 C 或者是 A 的反密码子只可能与其 Watson-Crick 互补密码子配对（尽管事实上还没有一种已知的 tRNA 在其反密码子的第 3 位是 A 的）。如果 U 或者 G 占据了反密码子的第 3 位，则可能识别两种密码子。I 在反密码子的第 3 位可以和 U、C 或 A 配对。

把各种摆动配对的情况考虑在内，翻译遗传密码的所有 61 个编码三联体需要至少 31 种 tRNA（最低限度需要 32 种 tRNA，因为起始密码需要一个单独的 tRNA，节 26-4A）。大多数细胞有 32 种以上的 tRNA，有一些有同样的反密码子。事实上哺乳动物细胞有 150 种以上的 tRNA。有的生物含有独特的 tRNA（$\mathbf{tRNA^{Sec}}$），这种 tRNA 接载的**硒代半胱氨酸**（selenocysteine，Sec）是好几种酶的组分（见框 26-2）。

表 26-3　密码子-反密码子第 3 位允许形成的摆动配对组合

5′-反密码子碱基	3′-密码子碱基
C	G
A	U
U	A or G
G	U or C
I	U, C, or A

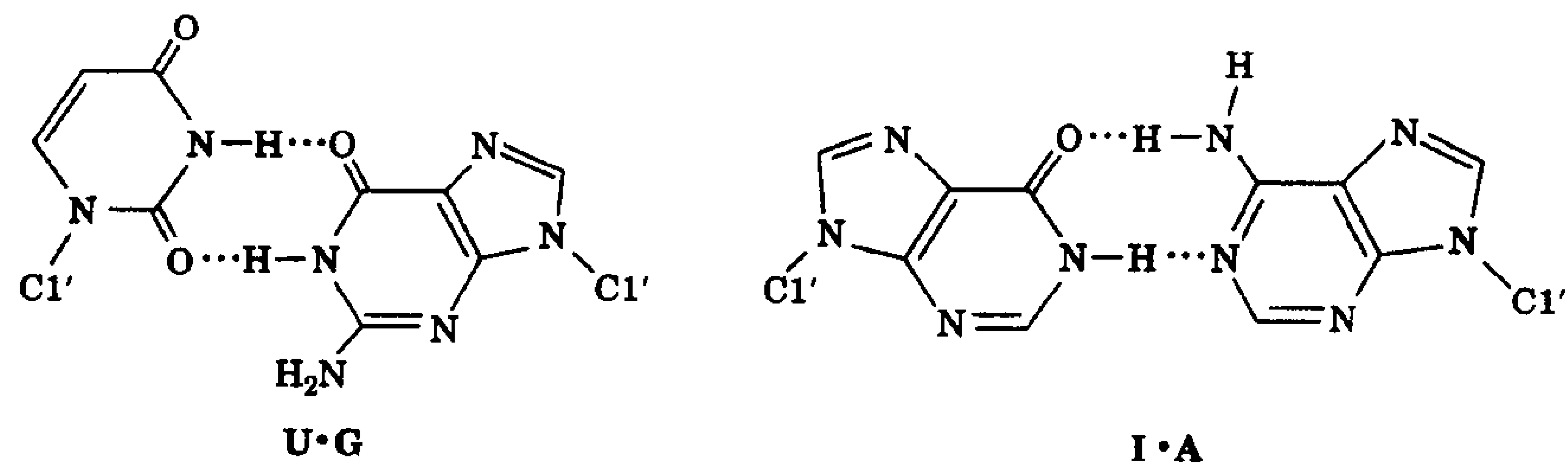
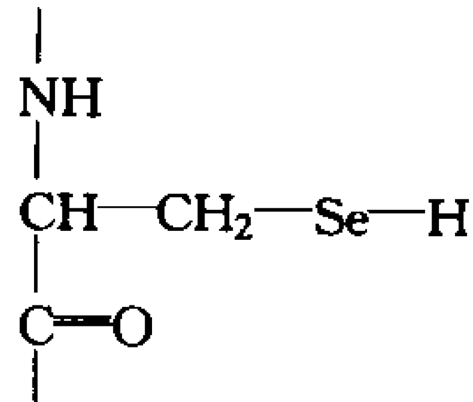


图 26-15　U·G 和 I·A 的摆动配对
两者均已在 X 射线结构中被观察到。

框 26-2　生物化学焦点

硒代半胱氨酸

硒，一种必需微量元素，是原核生物及真核生物中若干酶的一种组分。这些硒蛋白含有的硒代半胱氨酸残基(Sec)被认为可参与氧化还原反应，如哺乳动物硒蛋白谷胱甘肽过氧化物酶所催化的反应(框 14-3)。



硒代半胱氨酸残基

硒代半胱氨酸不是翻译后修饰的结果，而是在核糖体合成蛋白质的时候掺入的。这个“第 21 种”氨基酸的掺入，需要对标准的翻译机构作一些变动，包括一种独特的 tRNA，并将终止密码子 UGA 重新翻译为 Sec 密码子。

$tRNA^{Sec}$最初是在由 SerRS 催化的反应中装载上丝氨酸，这个 SerRS 和催化装载 $tRNA^{Ser}$的酶是同一个酶。产生的 Ser-$tRNA^{Sec}$在酶的催化下被硒化，生成硒代半胱氨酰-$tRNA^{Sec}$。尽管 $tRNA^{Sec}$必须和 $tRNA^{Ser}$足够相似，以便和相同的 SerRS 互相作用，但其受体臂有 8bp(而不是 7bp)，D 臂有一个 6bp 的柄和 4 个碱基环(而不是 4bp 的柄和 7～8 个碱基的环)，它的 TΨC 柄有 4bp 而不是 5bp，它的反密码子 UCA 识别 UGA 终止密码，而不是丝氨酸密码子。另外，若干在其他 tRNA 中恒定的残基在 $tRNA^{Sec}$中发生了改变。这些改变可以解释为什么 $tRNA^{Sec}$不被常规的蛋白质合成机构所识别。在正常情况下，这种机构在核糖体上把 tRNA 结合的氨酰基加到一条正在延伸的多肽链上。相反，需要有一个专门的蛋白质(一种特殊的延伸因子)把 Sec-$tRNA^{Sec}$传送到核糖体上。只要 mRNA 的局部结构支持对终止密码子的通读，这个蛋白质就允许 UGA 密码子被解读为“Sec”而不是“终止”密码。一个位于 mRNA 3′非翻译区的元件决定了 UGA 是被解读为终止密码子还是 Sec 密码子。

频繁使用的密码子和丰度最高的 tRNA 种类是互补的

对酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)的若干高表达结构基因的碱基序列分析表明,它们的密码子的使用有明显的偏爱性。61 种编码三联体中只有 25 种是通常使用的。*优先的密码子是那些在 Watson-Crick 意义上与反密码子最接近互补的、且为每一组同功 tRNA 中丰度最高的密码子种类*。在大肠杆菌中也存在类似的现象,尽管在其 22 种偏爱的密码子中,有某些和酵母所偏爱的密码子不同。在这两类生物中,一个给定基因中偏爱密码子的出现程度都和基因表达的水平有很强的相关性。这可能容许那些需要高丰度表达的蛋白的 mRNA 可以快速而平稳地得到翻译。

861

3. 核糖体

核糖体是小型的细胞器,曾一度被认为是细胞破碎形成的人工产物。1955 年被 Paul Zamecnik 确认为是蛋白质合成的场所,他证明被^{14}C 标记的氨基酸在出现于自由的蛋白质中之前,和核糖体有短暂的结合。由于其巨大的分子质量(在大肠杆菌中为 2520kDa,在哺乳类中为 4220kDa)和高度的复杂性(核糖体含有一些大的 RNA 分子以及几十种不同的蛋白质),核糖体在原子水平上的结构细节目前还不清楚。这种复杂性对核糖体行使下列功能是必需的:

1)核糖体和 mRNA 的结合使 mRNA 的密码子可以和 tRNA 的反密码子以很高的可靠性相互配对;

2)核糖体有许多特异的结合位点,包括:进入的氨酰-tRNA 的结合位点、带有延伸中的肽链的 tRNA(**肽酰-tRNA**)的结合位点、以及刚释放了氨酰基的 tRNA 的结合位点;

862

3)核糖体介导那些促进多肽链起始、延伸和终止的非核糖体蛋白因子之间的相互作用;

4)核糖体催化肽酰-tRNA 和新进入的氨酰-tRNA 之间肽键的形成;

5)核糖体执行新延伸的肽酰-tRNA 和 mRNA 的转位,从而通过解读按顺序排列的密码子合成多肽链。

大肠杆菌核糖体的结构

大肠杆菌核糖体的沉降系数为 70S。James Watson 发现,核糖体由两个不相同的亚基组成(表 26-4)。核糖体的小亚基(30S)由一个 **16S rRNA** 分子和 21 种不同的多肽构成,而大亚基(50S)含有一分子 **5S** 和 **23S rRNA** 以及 31 种不同的多肽。在一个大肠杆菌细胞中,核糖体多达 20 000 个,占细菌 RNA 含量的 80%和蛋白质含量的 10%。

核糖体的总体形状最初是从核糖体亚基的不同角度观察的电子显微镜照片中推测出来的(图 26-16)。显示更为精细的三维结构细节的模型最终是通过**冷冻电子显微镜**获得的,这项技术把样品包埋在透明的(玻璃样的)冰中,因而比普通电镜方法可在更大程度上保留样品的天然形态。这项技术显示,*核糖体决非是一个实心的结构,其特征是有为数众多的小叶和突起,并且布满了沟槽和孔洞*(图 26-17a),很像一块瑞士奶酪。这种情形在嗜盐(好盐的)菌 *Haloarcula marismortui* 的核糖体大亚基的 X 射线结构中可以看得更为清楚,此分辨率为 9Å 的结构是由 Joachim Frank、Peter Moore 和 Steitz 测定的(图 26-17b)。

表 26-4　大肠杆菌核糖体的组分

	核糖体	小亚基	大亚基
沉降系数	70S	30S	50S
分子质量/kDa	2520	930	1590
RNA			
较大的		16S, 1542 核苷酸	23S, 2904 核苷酸
较小的			5S, 120 核苷酸
RNA 分子质量/kDa	1664	560	1104
分子质量比例	66%	60%	70%
蛋白质		21 个多肽	31 个多肽
蛋白质分子质量/kDa	857	370	487
分子质量比例	34%	40%	30%

设想 mRNA 是像线一样穿过 30S 亚基的通道的，这些通道非常狭窄，只能容许单股 RNA 链的穿过，因此防止了任何影响翻译过程的链内配对相互作用的发生。50S 亚基中的一个通道据说是容纳延伸中的多肽链的，其入口对着图 26-17a 中标为“P”的 tRNA 的—CCA 末端。

大肠杆菌的 16S rRNA 由 1542 个核苷酸构成，这些核苷酸被认为采用了如图 23-23 所示的花形二级结构。有趣的是，16S rRNA 的电镜照片和完整的 30S 亚基的电镜照片很相似，这提示 30S 亚基的整体形状主要取决于 16S rRNA。分别由 120 和 2904 个核苷酸构成的大肠杆菌核糖体大亚基的 5S 和 23S rRNA 的序列已被测定。和 16S rRNA 一样，它们也有广泛的二级结构。5S rRNA 的预测结构及其 61nt 的片段 I 的 X 射线结构见图 23-22。

864

大肠杆菌所有 52 种核糖体蛋白的氨基酸序列已经阐明。它们的大小范围在 46～557 个残基之间。这些蛋白质的大多数互相之间几乎不存在序列相似性，但富含碱性氨基酸 Lys 和 Arg，并且只含很少的芳香族氨基酸残基，这种情况与对紧密结合多聚阴离子 RNA 分子的蛋白质的预期是一致的。

按照习惯，小亚基和大亚基的核糖体蛋白分别以前缀 S 和 L 命名，后随一个数字表明它们在双向凝胶电泳图谱中从左上到右下所处的位置（大致按分子量递降的顺序）。只有蛋白质 S20/L26 是两个亚基共有的，它显然位于两个亚基的交界面上。有一个大亚基蛋白质的 N 端是部分乙酰化的，因此产生了两个电泳斑点（L7/L12），这种蛋白质在大亚基中有 4 个拷贝。而且这个蛋白质的 4 个拷贝和 L10 聚集，形成一个稳定的复合体，这个复合体起先被认为是一种独特的蛋白“L8”。其他所有核糖体蛋白在每个亚基中只有一个拷贝。

14 种核糖体蛋白的 X 射线或 NMR 结构主要是由 Stephen White 和 Anders Liljas 测定的。有趣的是，它们中的许多都含有同源结构基序，这些模体由一个 3 股反平行 β 折叠的结构组成，其中每 2 股和一个 α 螺旋相连（图 26-18）。这个结构基序在 **U1-snRNA A 蛋白**（节 25-3A）的 X 射线结构中也被观察到，通过序列同源性分析，表明此模体可能是众多不同 RNA 结合蛋白的一个结构组分，这些 RNA 结合蛋白包括转录终止因子 rho（节 25-1D）、poly(A)结合蛋白（节 25-3A）和一种真核翻译因子。这种蛋白折叠因此被称为 **RNA 识别基序**（RRM）。所有这些蛋白质据推测是从一个古老的 RNA 结合蛋白进化而来的。

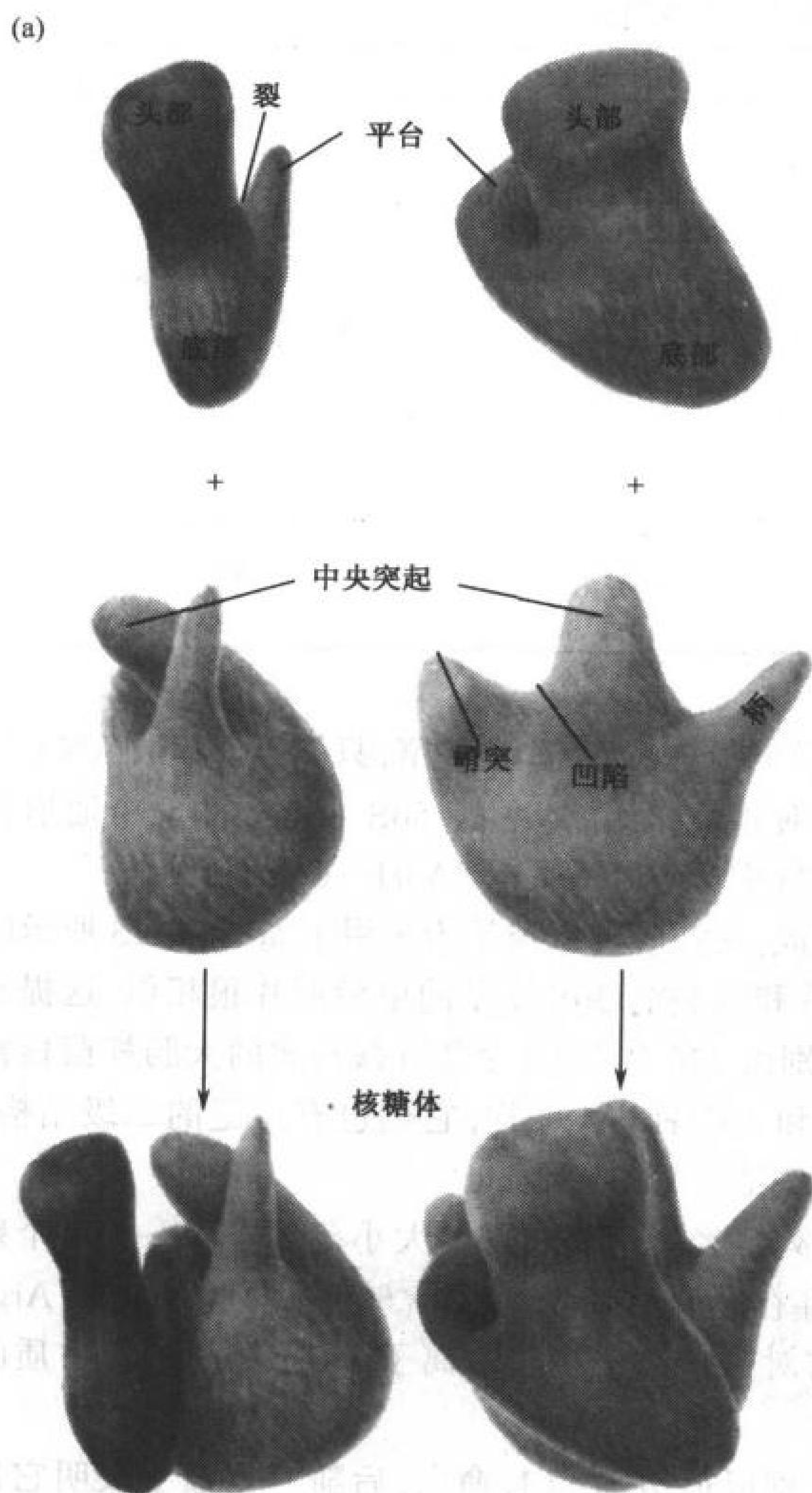
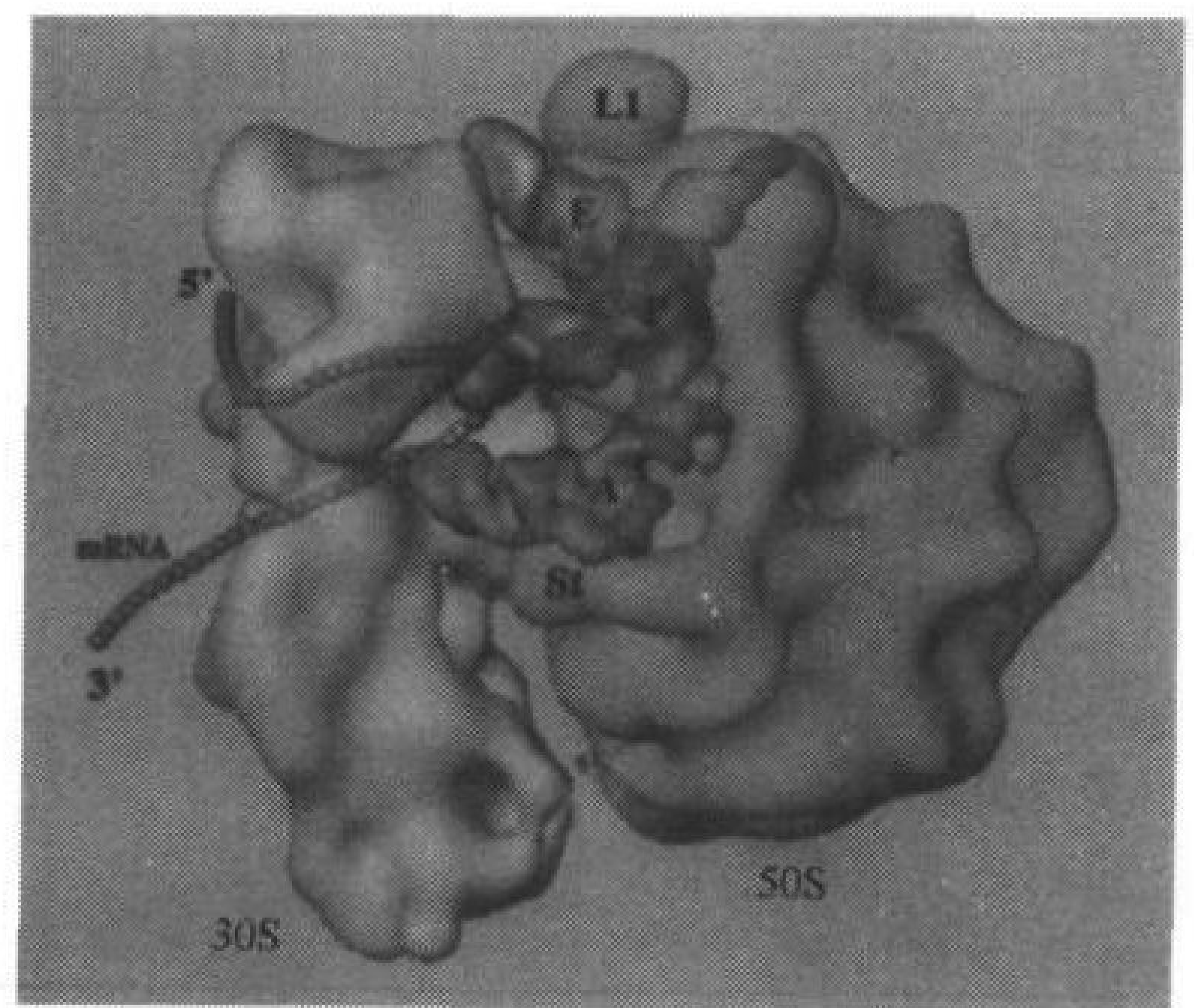
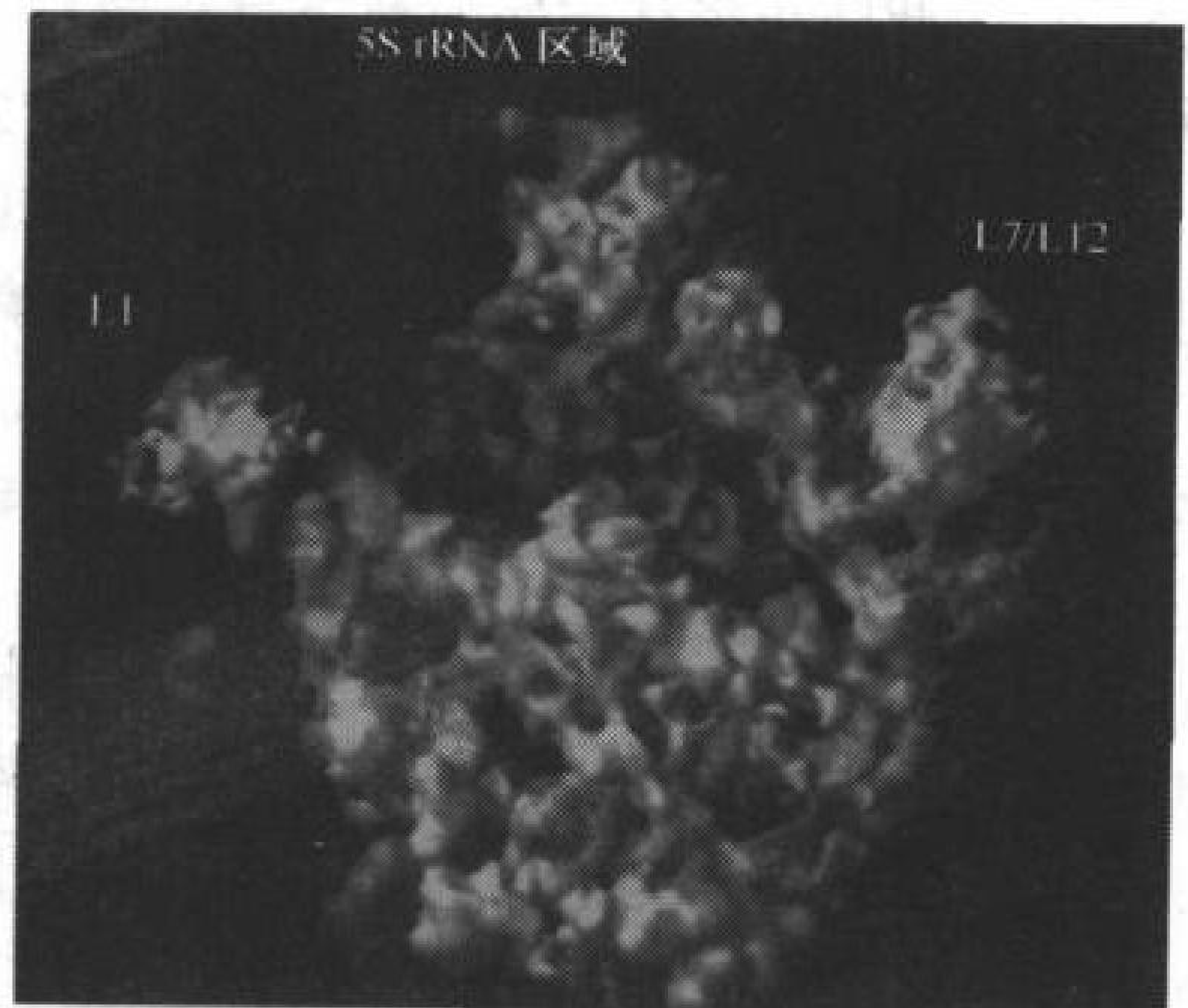


图 26-16 大肠杆菌核糖体

(a)一个三维模型。小亚基(上部)和大亚基(中间)合在一起,组成完整的核糖体(底部)。核糖体的两面观与电子显微镜照片(b)中观察到的情况是吻合的。(引自 James Lake, UCLA)



(a)



(b)

图 26-17 核糖体的结构

(a)分辨率约为 25Å 的半透明的核糖体三维模型。30S 亚基(浅绿色)在左侧,50S 亚基(蓝色)在右侧。推测占据 A、P 和 E 位点(节 26-4B)的 tRNA 用紫红色、绿色和金黄色表示。可能的 mRNA 通路用一串珠子代表,其中有 6 个核苷酸和 A 位及 P 位的 tRNA 接触,分别用蓝色和紫色表示,其余的核苷酸是橘黄色的。可以看见一个贯穿 50S 亚基通道的一部分(右侧中央)。符号 L1 和 St 标识 L1 蛋白和 50S 亚基的柄(图 26-16a)。(Courtesy of Joachim Frank, State University of New York of Albany)(b)分辨率为 9Å 的 *H. marismortui* 核糖体大亚基的 X 射线结构。符号标明的是先前确认的结构特征(见图 26-19)。其中可以看到某些结构特征的形状、直径和右手扭转,和 RNA 的双螺旋区段一致。(引自 Joachim Frank, State University of New York at Albany, and Thomas Steitz and Peter Moore, Yale University)

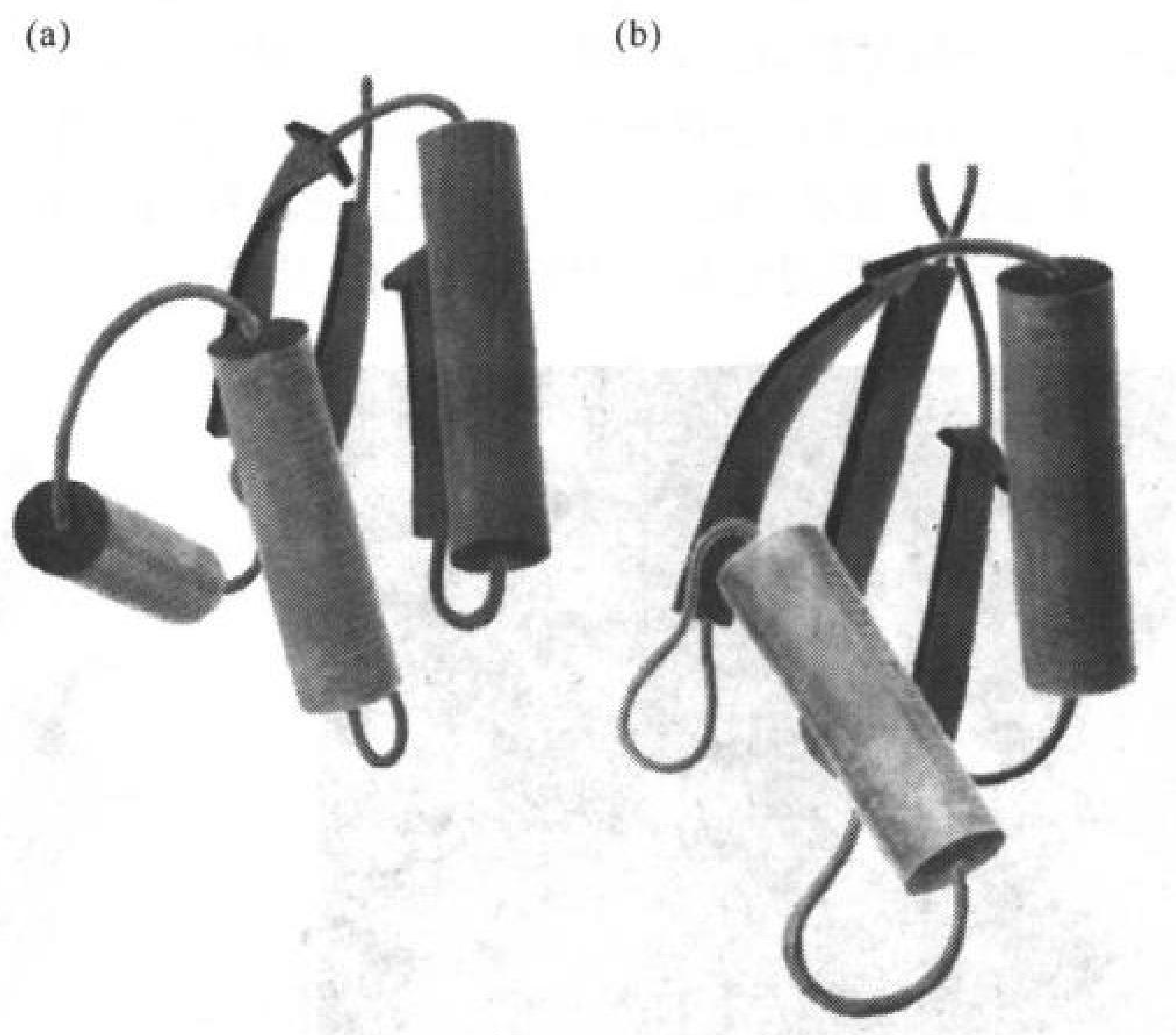


图 26-18 两个核糖体蛋白的 X 射线结构

(a)大肠杆菌 L7/L12 的 74 个残基的 C 末端片段。(b)*Bacillus stearothermophilus* L30(61 个残基)。这两个蛋白质分子的取向作了调整，以显示它们非常相似的 RNA 识别模体(RRM, 深阴影部分)。[引自 Leijonmarck, M., Appelt, K., Badger, J., Liljas, A., Wilson, KS., and White, S.W., Proteins 3, 244(1988)]

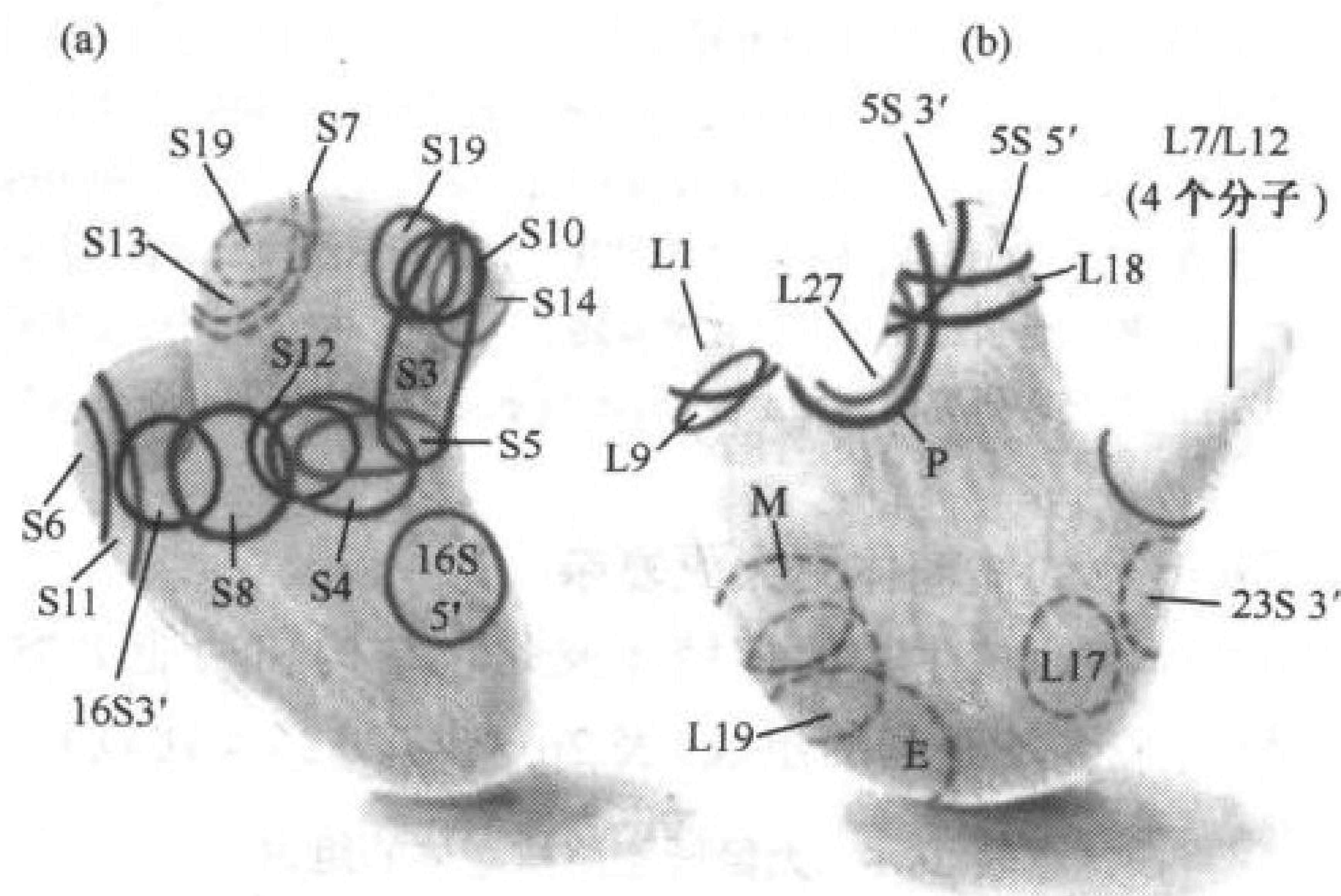


图 26-19 大肠杆菌核糖体亚基图谱

采用免疫电子显微术确定一些蛋白质在核糖体小亚基(a)和大亚基(b)上的定位。断线标识的位点位于亚基的背面。在小亚基中，符号 16S 3′和 16S 5′标明 16S rRNA 的末端。大亚基中，P 表示肽酰转移酶位点，E 标明新生的多肽从核糖体中冒出来的地方(图 26-17 中 50 S 亚基通道的末端)，M 指明的是核糖体的质膜锚定位点，而 5S 3′和 5S 5′表示 5S rRNA 的末端。[引自 Lake, J.A., Annu. Rev, Biochem. 54, 512(1985)]

大多数核糖体组分的位置是通过各种物理和化学方法测定的。许多蛋白质是由 James Lake 和 Georg Stöffler 通过**免疫电子显微术**定位的。当某种特定的核糖体蛋白暴露在亚基的表面时，对抗这种蛋白的兔抗体就可以与之结合。核糖体亚基-抗体复合物的电镜术可以显示抗体所附

着的位点，因而也标明了其结合的核糖体蛋白所在的位点（图 26-19）。Donald Engleman 和 Moore 对 30S 亚基所做的中子散射测定证实并扩展了这些结果（图 26-20a）。许多 16S rRNA 的二级结构元件（图 23-23）已经被定位在小亚基上（图 26-20b）。它们的位置是间接通过已知蛋白质的位置来确定的。核酸酶保护以及 RNA-蛋白质交联实验表明，这些蛋白质和这些元件结合。因此，我们现在有了一个虽然粗糙但是完整的大肠杆菌 30S 核糖体亚基的模型。

865

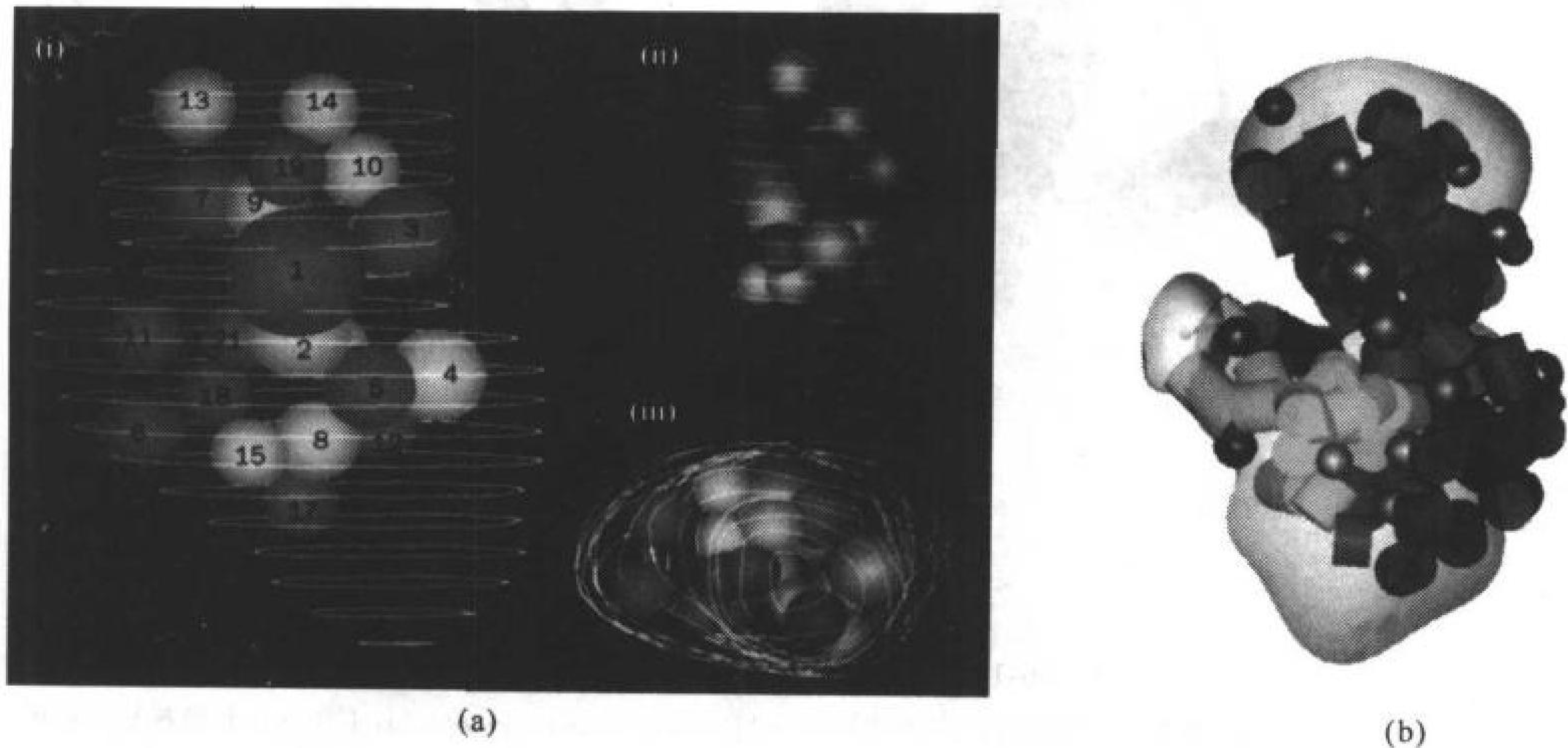


图 26-20　核糖体 30S 亚基的结构

(a)叠加在 30S 亚基外形轮廓上的全部 30S 亚基的 21 个蛋白质的相对位置。分别为(i)前面观，(ii)左面观，(iii)底面观。在(i)中蛋白质被编上它们的标准号码(S20 直接位于 S3 后面；球的不同颜色只是为了帮助观察)。每个球的体积和其相应蛋白质的分子量成正比，球的位置标志蛋白质的质量中心。将此图和图 26-19 比较。(引自 Peter Moore, Yale University, and Malcolm Capel, Brookhaven National Laboratory)(b)模型表示 16S rRNA 的双螺旋元件的位置(除了结构域 III 和 IV 都是蓝色的以外，圆柱体根据如图 23-23 所示结构域着色)以及基于电镜的 30S 亚基的轮廓(透明的灰色表面)。这个模型是通过能量最低化计算建立起来的，由一系列通过实验确定的距离所限定，这些距离的测定主要是建立在化学交联研究的基础上。(引自 Stephen Harvey, University of Alabama at Birmingham)

866

真核生物的核糖体比原核生物的核糖体更大更复杂

尽管真核生物的核糖体和原核生物的核糖体彼此在结构和功能上类似，但两者在几乎所有的细节上都有差别，包括分子量及亚基的组成（表 26-5；与表 26-4 比较）。大鼠肝细胞质核糖体

表 26-5　大鼠肝胞浆核糖体的组成

	核糖体	小亚基	大亚基
沉降系数	80S	40S	60S
分子质量/kDa	4220	1400	2820
RNA			
较大的		18S, 1874 核苷酸	28S, 4718 核苷酸
较小的			5.8S, 160 核苷酸 5S, 120 核苷酸
RNA 分子质量/kDa	2520	700	1820
分子质量比例	60%	50%	65%
蛋白质		33 个多肽	49 个多肽
蛋白质分子质量/kDa	1700	700	1000
分子质量比例	40%	50%	35%

是研究得最清楚的真核核糖体，它的小亚基(40S)由33种独特的多肽和一个18S rRNA构成。其大亚基(60S)含有49种不同的多肽，以及28S、5.8S和5S3种rRNA。

真核18S和**28S rRNA**与原核16S和23S rRNA在二级结构上相似(图26-21)。在真核大亚基中出现的**5.8S rRNA**与28S rRNA以碱基配对形式形成复合物，其序列和原核23S rRNA 5′末端是同源的。显然，5.8S rRNA是由突变产生的，这突变改变了rRNA的转录后加工过程，并导致了第4种rRNA的产生。

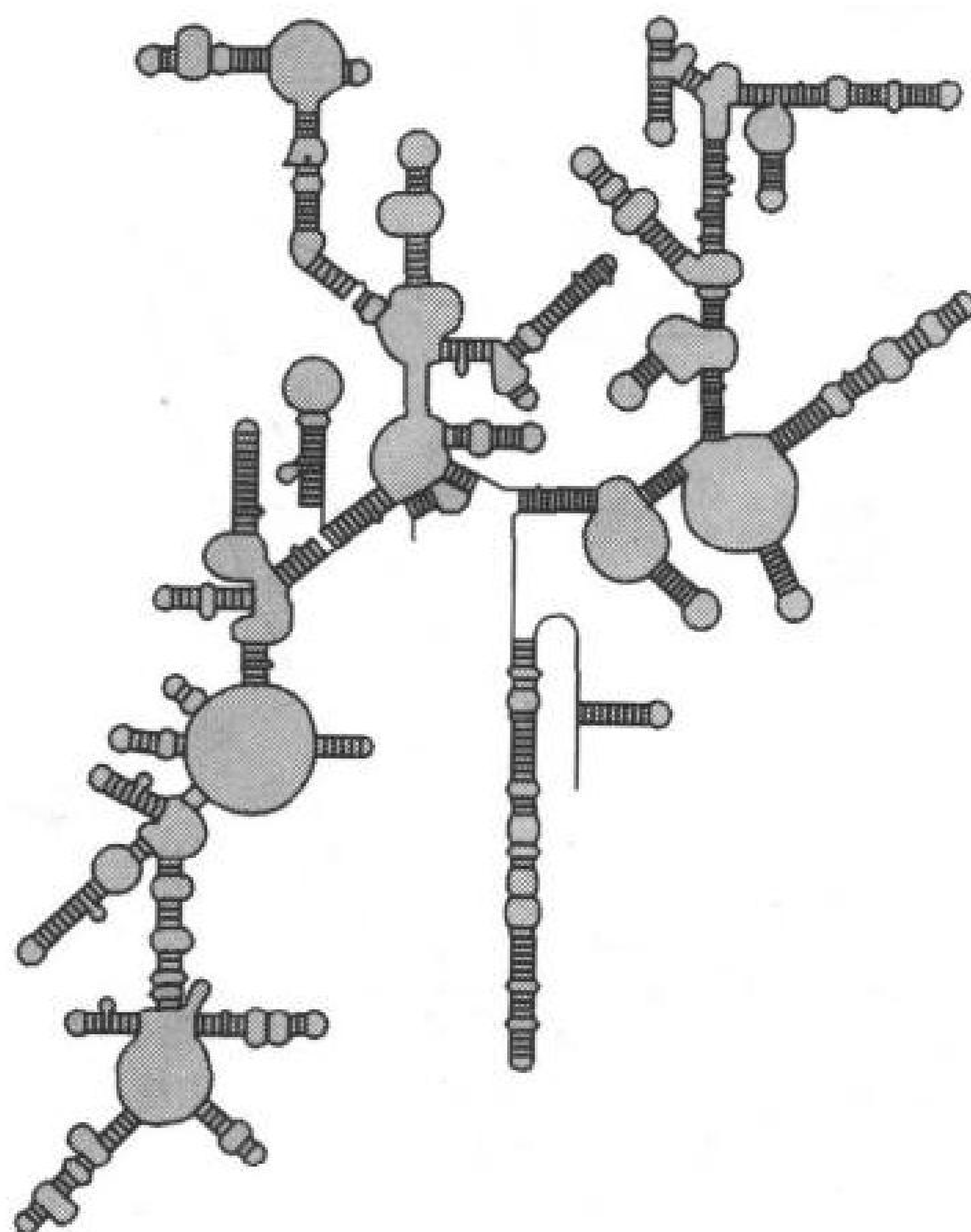


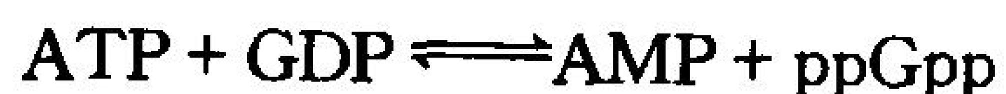
图26-21 预测的酿酒酵母18S rRNA的二级结构

和图23-23预测的大肠杆菌16S rRNA的二级结构比较，注意这些部件的高度相似性；它们的主要差别在于在茎环结构中的插入和缺失。[引自Gutell, R.R., Weiseg, B., Woese, C. R., and Noller, H. F., Prog. Nucleic Acid Res. Mol.Biol .32, 183(1985)]

核糖体亚基的自我组装

在适当的情况下，大肠杆菌核糖体亚基可以在含有其众多的大分子组分的混合物中自我装配。Masayasu Nomura通过部分重建实验测定了这种自组装是如何发生的。在一种原本可以自我装配的蛋白质和RNA的混合物中，如果省略一种大分子组分导致装配不能进行，那么那些不能结合到已部分装配的亚基的其他组分，必然以某种方式和省略的组分有相互作用。这些实验表明核糖体小亚基装配的第一步是某些蛋白质和16S rRNA的自由结合，生成的复合物为其他蛋白质的结合提供了分子支架。大亚基以类似的方式进行自我组装。

在体内核糖体自我组装需要适当数量的核糖体RNA和蛋白质。因此，rRNA和核糖体蛋白的表达必然是协调进行的。在真核细胞中，核仁内的核糖体装配还需要把胞质产生的核糖体蛋白转运到核内。细胞调节其核糖体的含量，以配合在旺盛生长条件下蛋白质合成的速率。例如，在大肠杆菌中，rRNA合成的速率是通过**严谨反应**(stringent response)和蛋白合成速率联系在一起的。当任何一种被装载的tRNA短缺(通常是“严谨”或恶劣的生长条件的结果)而限制蛋白质合成速率时，这种调控机制就发挥作用。一个核糖体结合了一个未荷载的tRNA，显然通过刺激一种称为**应急因子**(stringent factor)的蛋白质，催化合成**ppGpp**来报告氨基酸的匮乏。



$$\text{ATP} + \text{GDP} \rightleftharpoons \text{AMP} + \text{ppGpp}$$

这种不寻常的核苷酸，作为一种胞内信使，导致转录rRNA和tRNA基因的速率下降10～20倍。ppGpp还能刺激涉及氨基酸生物合成的基因的转录，并且抑制涉及诸如DNA复制以及糖生物合成等代谢过程的基因的转录。这样，细胞就有了耐受营养剥夺的准备。ppGpp激活某些基因的转录，同时又可抑制其他基因转录的能力提示，它是通过改变RNA聚合酶的启动子的专一性发挥作用的。

4. 多肽的合成

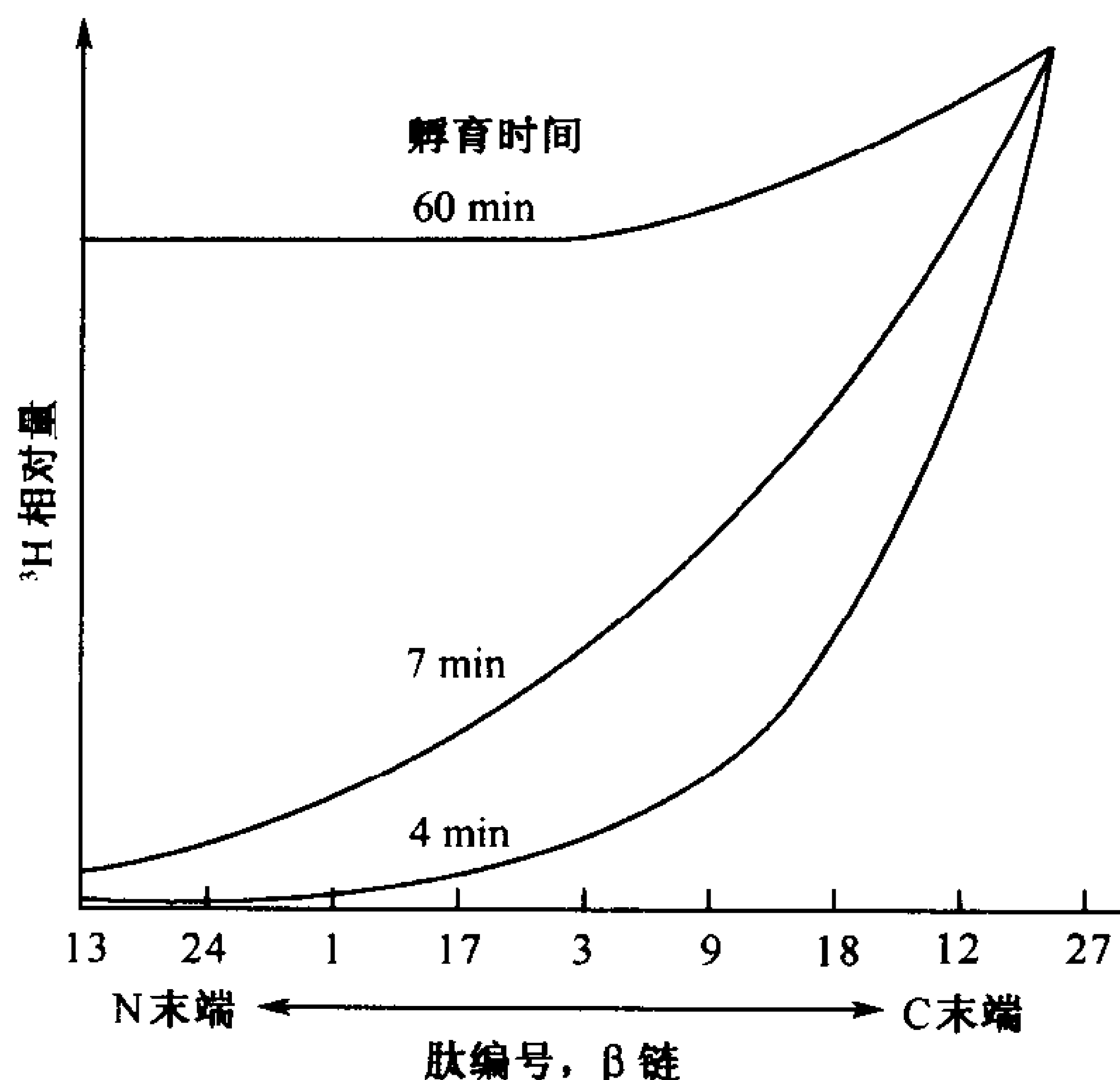


图 26-22 多肽从 N 端向 C 端合成的展示
兔网织红细胞与[³H]亮氨酸孵育如所示的时间。曲线显示[³H]亮氨酸在来自可溶性兔血红蛋白 β 亚基的胰蛋白酶解肽段中的分布情况。水平轴数字表示从 N 端向 C 端排列的被检肽段的数目。[引自 Dintzis, H.M., Proc. Natl. Acad. Sci. 47, 225 (1961)]

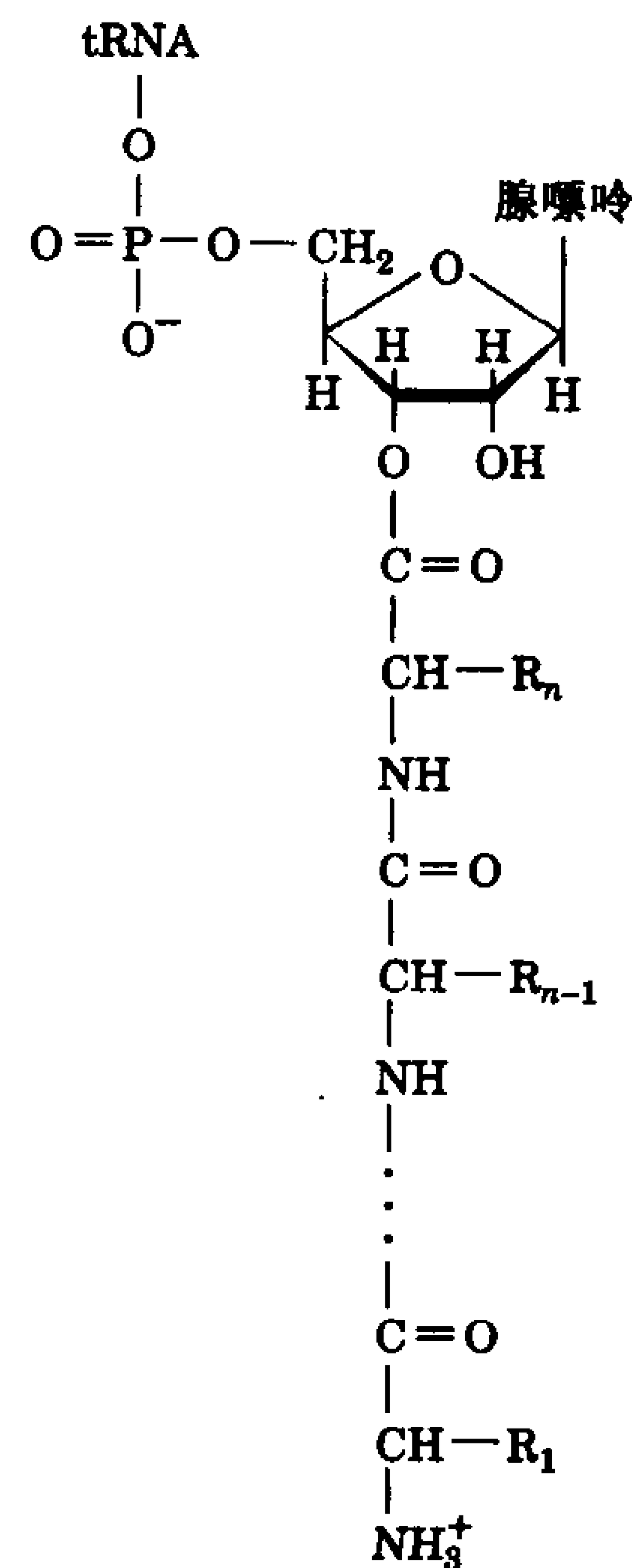
要弄清楚核糖体协调控制 mRNA 翻译合成多肽的机制，了解下列要点会有所帮助。

1)*多肽合成是从 N 端向 C 端进行的*；即**肽酰转移酶**的活性是把一个新进入的氨基酸添加到一条生长着的多肽链的 C 末端。看来情况确实如此。1961 年 Howard Dintzis 证实了这一点。他把活跃地合成血红蛋白的网织红细胞(不成熟的红细胞)置于 ^3H 标记的亮氨酸中，时间短于合成一条完整的多肽所需的时间。结果发现，来自可溶性(完整的)血红蛋白分子的胰蛋白酶解肽段被标记了，被标记的程度随着肽链靠近 C 末端而递增(图 26-22)。从而表明新进入的氨基酸是添加在生长中的多肽链的 C 末端的。

868

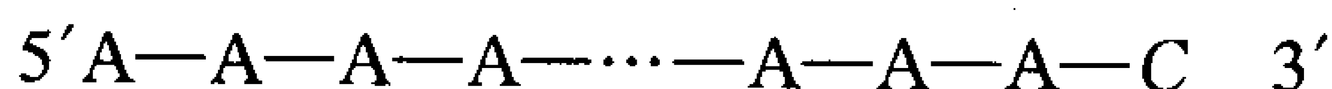
2)*链的延伸是靠生长中的多肽和新进入的 tRNA 的氨基酸残基连接实现的*。如果生长中的多肽用高浓度的盐处理，使之从核糖体中释放出来，则其 C 末端残基会酯化到 tRNA 上形成肽酰-tRNA。因此，新生多肽的生长方式必然是以从肽酰-tRNA 转移到新进入的氨酰-tRNA 上，生成多一个残基的肽酰-tRNA(图 26-23)。核糖体在所谓的 **A(氨酰基)位点**上结合新进入的氨酰-tRNA，在 **P(肽酰基)位点**上结合肽酰-tRNA。当肽键生成之后，占据着 A 位点的新生肽酰-tRNA 被转位到 P 位点上，这样，一个新的氨酰-tRNA 就又可进入 A 位点(肽链延伸的细节将在节 26-4B 中介绍)。

869



肽酰-tRNA

3)*核糖体从 5′→3′方向解读 mRNA*。这是通过采用无细胞蛋白合成体系证明的，该体系中的 mRNA 是一个 3′末端带一个 C 的 poly(A)：



5′A—A—A—A—···—A—A—A—C 3′

这个体系合成一条 C 末端是 Asn 的 poly(Lys)：



H_3N^+—Lys—Lys—Lys—···Lys—Lys—Asn—COO^-

已知 AAA 和 AAC 是编码 Lys 和 Asn 的(表 26-1)，结合肽合成的极性，mRNA 的解读是从 5′→3′方向就成立了。由

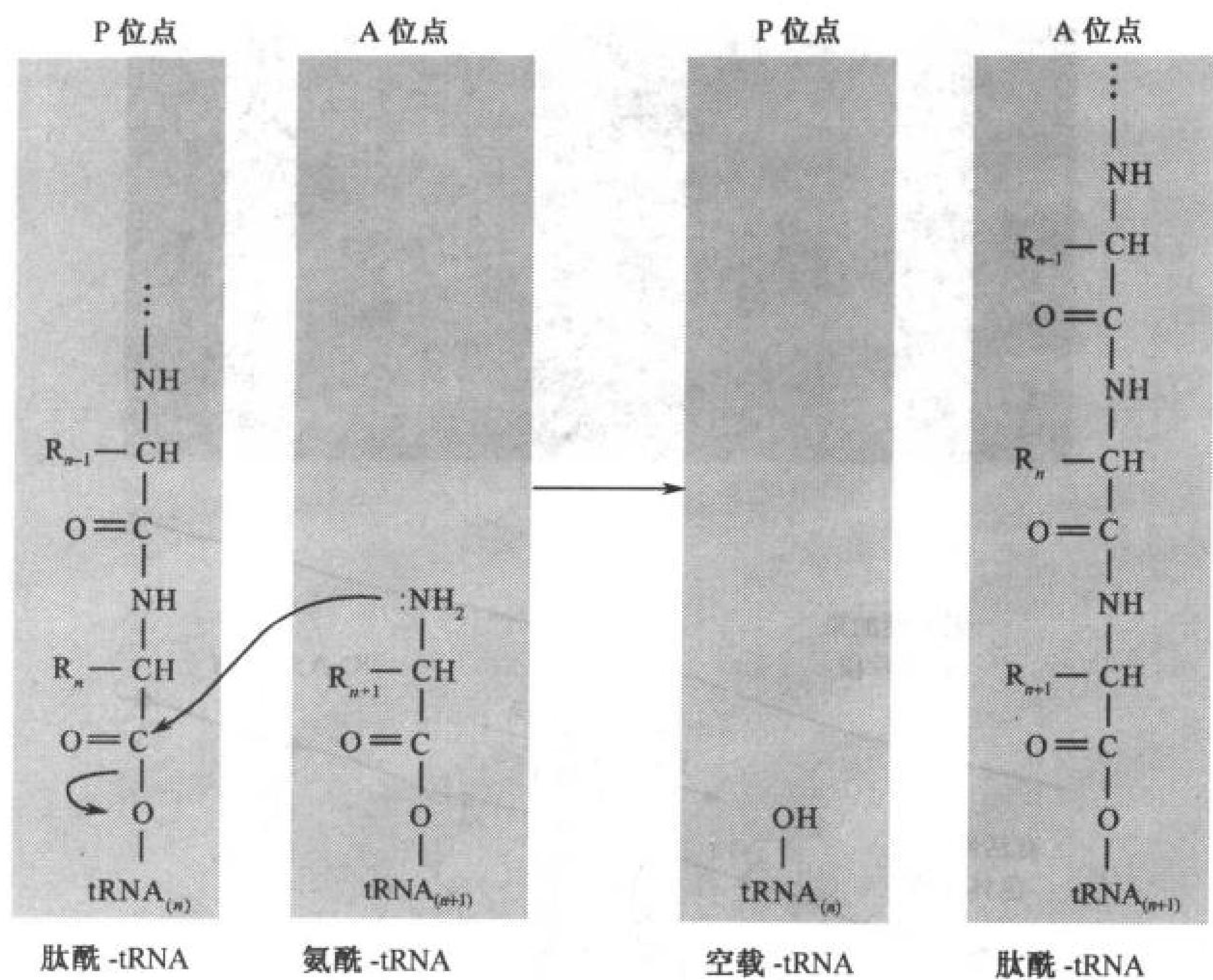


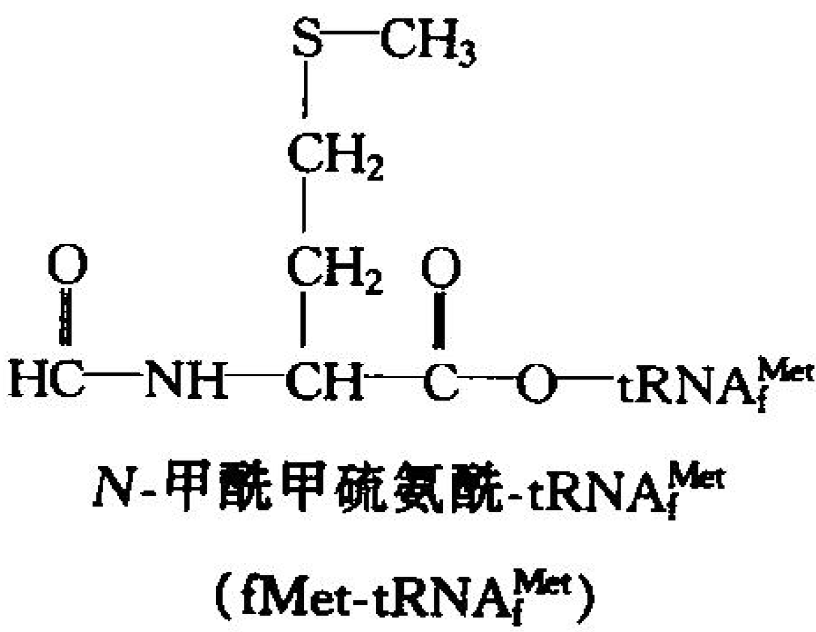
图 26-23　核糖体肽酰转移酶反应生成肽键
A 位点上的氨酰-tRNA 的氨基以亲核方式取代 P 位点上的肽酰-tRNA 酯的 tRNA，从而生成一个新的肽键，并把新生的多肽转移到 A 位点的 tRNA 上。

于 mRNA 也是从 5′→3′方向合成的，因此，原核生物的核糖体可以在新生 mRNA 从 RNA 聚合酶中露出来就开始进行翻译了(图 26-24)。然而，这在真核生物中是不可能的，因为核膜把转录的位点(细胞核)和翻译的位点(细胞质)隔开了。由于大多数原核 mRNA 在它们被合成后的 1～3min 之内就被酶降解了(这可在条件变化后削减对不需要的蛋白质合成的浪费)，有些 mRNA 的 5′端在其 3′端被合成出来之前就被降解了。 870

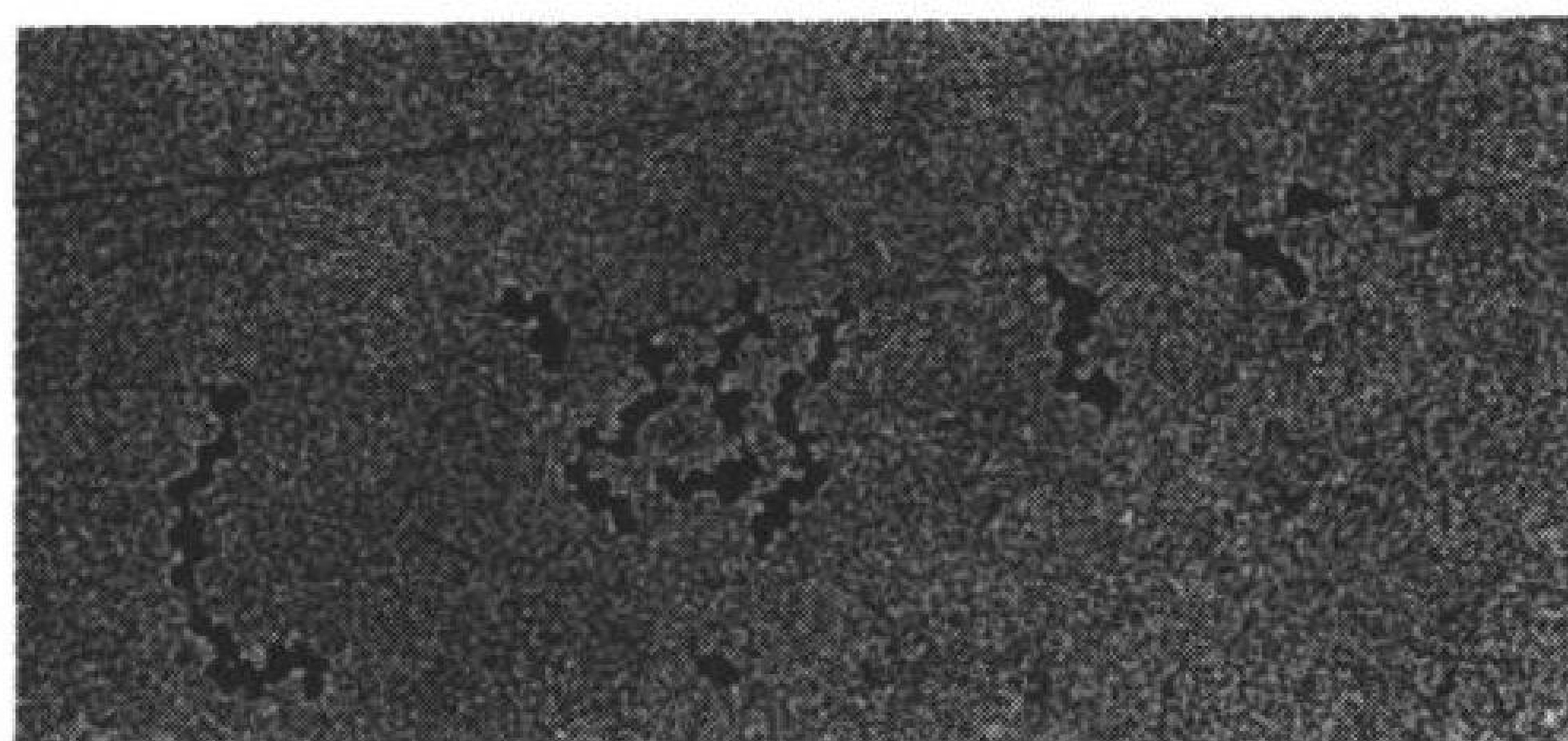
4) *多聚核糖体上发生活跃的翻译。*在原核生物和真核生物中，都会有多个核糖体结合在一个 mRNA 转录本上，从而形成了像一串珠子串在一根细绳子上一样的结构，叫做**多聚核糖体**(polyribosome；多核糖体 polysome；图 26-25)。每个核糖体之间被 50～150Å 的间隔隔开。多核糖体的出现是由于一旦一个活跃的核糖体通过了它在 mRNA 上的起始位点，第 2 个核糖体就能在那个位点起始翻译。

A. 肽链的起始

核糖体是如何起始合成多肽的呢？这种反应首先在大肠杆菌中观察到，几乎半数大肠杆菌的蛋白质都是以不常见的氨基酸 Met 开始的。事实上，起始翻译的 tRNA是一种 Met 残基被 *N*-甲酰化了的特殊形式的 Met-$tRNA^{Met}$(如右图)



N-甲酰甲硫氨酰-$tRNA_f^{Met}$
(fMet-$tRNA_f^{Met}$)



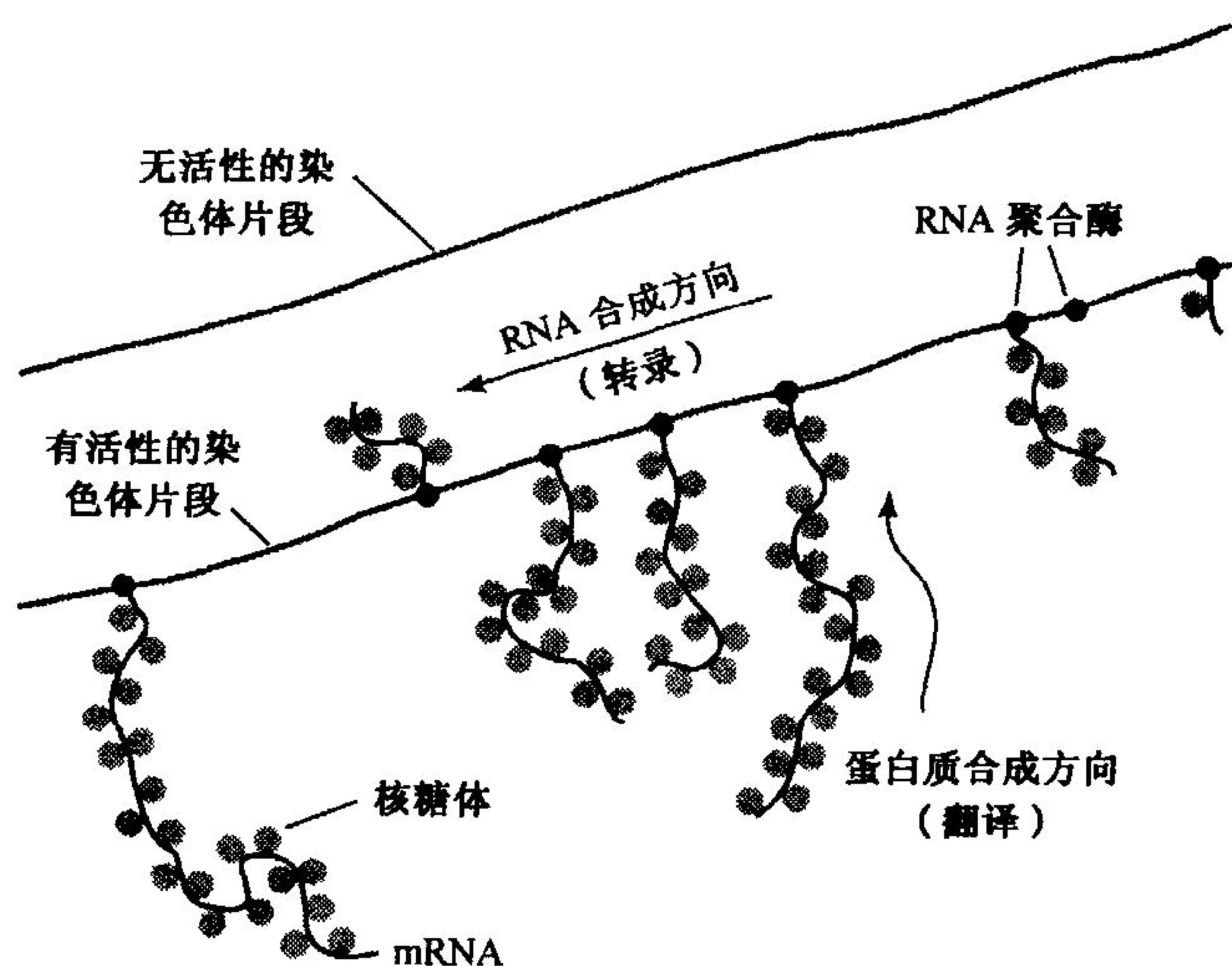


图 26-24 大肠杆菌基因同时进行转录和翻译

电镜照片及其图解显示 RNA 聚合酶分子正从右往左转录 DNA，同时核糖体正在翻译新生的 RNA（大多数从底部往顶部方向合成）。（引自 OscarL. Miller, Jr., and Barbara A. Hamkalo, University of Virginia）

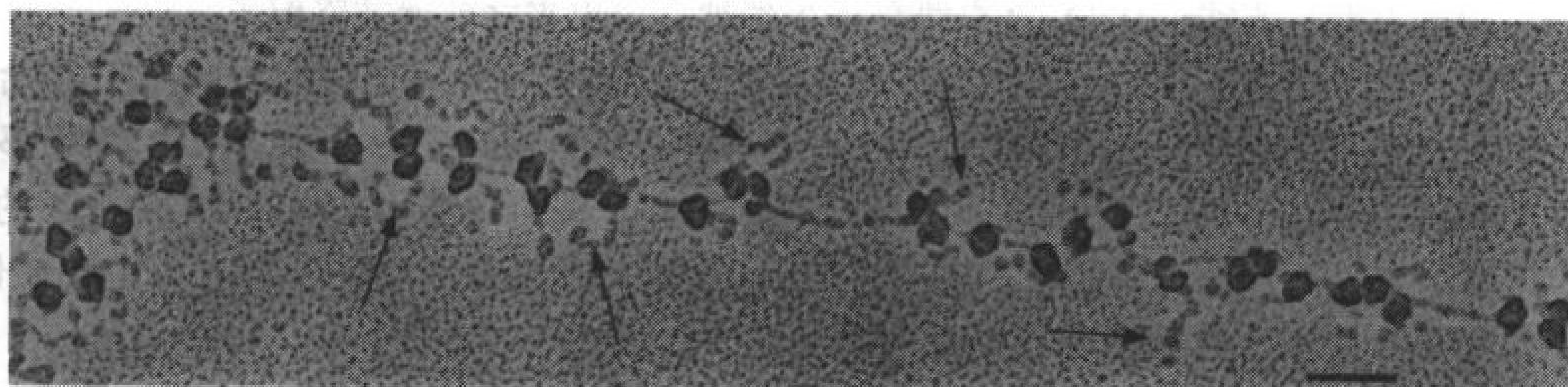


图 26-25 家蚕 *Bombyx mori* 丝腺细胞的多聚核糖体的电镜照片

mRNA 的 3′末端在左侧，箭头指向蚕丝丝心蛋白多肽，短线代表 0.1μm。（引自 Oscar L. Miller, Jr. and Steven L. McKnight, University of Virginia）

由于 ***N*-甲酰甲硫氨酸**（fMet）已经有了一个酰胺键，它只能成为多肽的 N 末端残基。大肠杆菌蛋白质通过 fMet 残基的去甲酰化被翻译后修饰，而且在许多蛋白质中，由此产生的 N 末端 Met 随后又被去除掉。这种过程通常发生在新生的多肽上，这就是为什么成熟的大肠杆菌蛋白质都

没有 fMet 的原因。

识别起始密码的 tRNA——$\mathbf{tRNA_f^{Met}}$，和携带内部 Met 残基的 tRNA——$\mathbf{tRNA_m^{Met}}$ 是不同的，尽管它们都识别同样的 AUG 密码子。也许，这些 tRNA 的构象差别已经大到足以使它们在肽链起始和延伸反应中被区分开来。 871

在大肠杆菌中，未装载的 $tRNA_f^{Met}$ 是由装载 $tRNA_m^{Met}$ 的同样的 MetRS 催化装载 Met 的氨酰化反应的。产生的 Met-$tRNA_f^{Met}$ 以 N^{10}-甲酰四氢叶酸(节 20-4D)作为其甲酰基供体，被甲酰转移酶专一地 *N*-甲酰化，产生 fMet-$tRNA_f^{Met}$，这种转移酶不识别 Met-$tRNA_m^{Met}$。

mRNA 和 16S rRNA 之间的碱基配对帮助翻译起始位点的选择

AUG 编码多肽的内部 Met 和起始 Met 残基。而且，mRNA 通常在不同的阅读框中含有许多 AUG(和 GUG)。显然，*一个翻译起始位点不是仅仅由一个起始密码子所确定的。*

在大肠杆菌中，16S rRNA 在其 3′端含有一段富含嘧啶的序列。1974 年，John Shine 和 Lynn Dalgarno 指出，这段序列和一段富含嘌呤的 3～10 个核苷酸的 **Shine-Dalgarno 序列**是部分互补的，后者的中心位置在几乎所有已知原核 mRNA 的起始密码子的上游约 10 个核苷酸处(图 26-26)。*mRNA 的 Shine-Dalgarno 序列和 16S rRNA 之间的碱基配对作用，显然允许核糖体选择适当的起始密码子。*

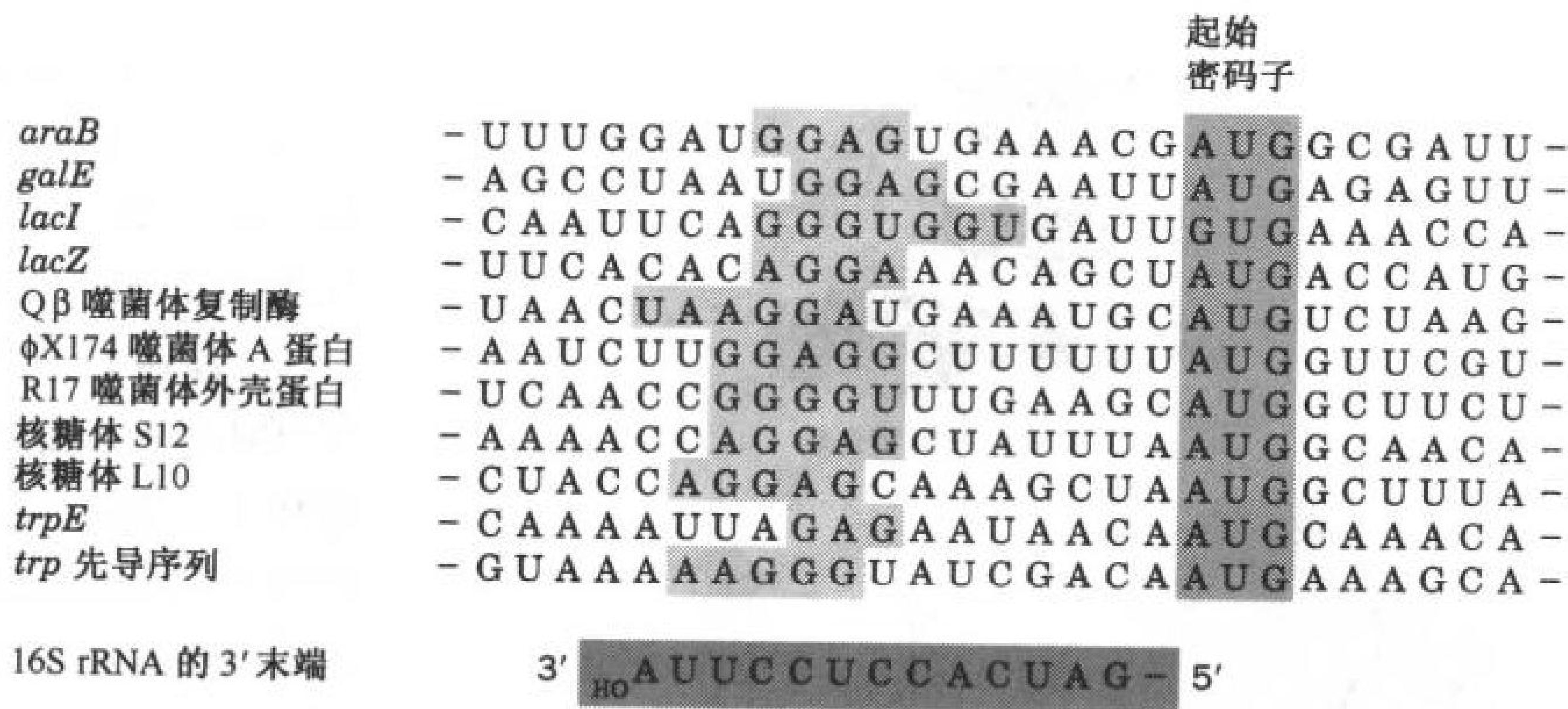


图 26-26　一些被大肠杆菌核糖体所识别的翻译起始序列

RNA 根据其起始密码子(蓝色阴影)排列。它们的 Shine-Dalgarno 序列(红色阴影)和 16S RNA 的 3′末端(下方)的一部分是互补的(包括 G·U 配对)。[引自 Steitz, J.A., in Chambliss, G., Craven, G.R., Davies, J., Davis, K., Kahan, L., and Nomura, M. (Eds.), Ribosomes. Structure, Function and Genetics, pp. 481-482, University Park Press (1979)]

翻译起始需要可溶性蛋白质因子

大肠杆菌翻译的起始是一个复杂的过程，在这个过程中，两个核糖体亚基和 fMet-$tRNA_f^{Met}$ 在一条适当排列的 mRNA 上装配形成一个可以开始肽链延伸的复合体。这个过程还需要一些非永久性地和核糖体结合的**起始因子**(initiation factor)，在大肠杆菌中称作 **IF-1**、**IF-2** 和 **IF-3**(表 26-6)。 872

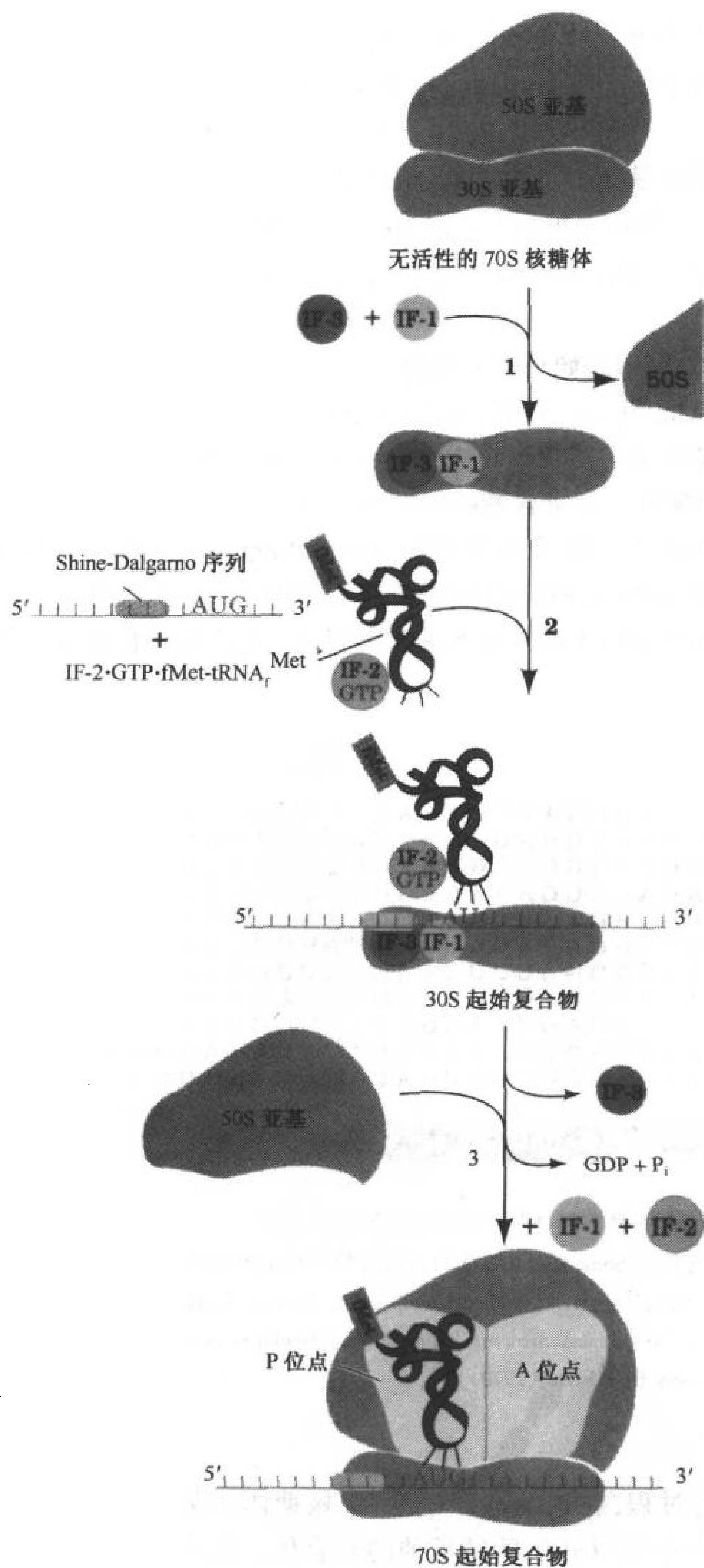


图 26-27 大肠杆菌核糖体中翻译起始的途径

大肠杆菌翻译的起始存在 3 个时期(图 26-27)。

1) 在完成了一轮多肽合成以后,30S 和 50S 亚基以无活性的 70S 核糖体的形式保持着结合状态。IF-3 和 30S 亚基结合,以促进这个复合物的解离。IF-1 可能通过帮助 IF-3 的结合而提高这种解离的速率。

2) 随后 mRNA 和三元复合物 IF-2·GTP·fMet-tRNA$_f^{Met}$ 中的 IF-2。按任意顺序跟 30S 核糖体亚基结合。由于含 fMet-tRNA$_f^{Met}$ 的三元复合物可以在 mRNA 之前与核糖体结合,因此 fMet-tRNA$_f^{Met}$ 的结合必然不是由密码子-反密码子的相互作用介导的。这是惟一不需要这种相互作用的 tRNA-核糖体的结合,尽管这种相互作用有助于 fMet-tRNA$_f^{Met}$ 结合到核糖体上。IF-3 也在起始过程的这个阶段通过帮助 30S 亚基与 mRNA 结合而发挥作用。

3) 在一个以 IF-3 释放为前提的过程中,50S 亚基通过刺激 IF-2 水解其结合的 GTP 生成 GDP + P_i 而加入到 30S 起始复合物中。这个不可逆的反应改变了 30S 亚基的构象,并释放 IF-1 和 IF-2,以参与进一步的起始反应。

起始导致了 fMet-tRNA$_f^{Met}$·mRNA·核糖体复合物的形成,在这个复合物中,fMet-tRNA$_f^{Met}$ 占据了核糖体的 P 位点,而核糖体的 A 位点已经准备好接受氨酰-tRNA 的进入。注意,tRNA$_f^{Met}$ 是惟一直接进入 P 位点的 tRNA。其他所有 tRNA 在肽链延伸过

程中首先必须进入 A 位点。

表 26-6　大肠杆菌蛋白质合成所需的可溶性蛋白因子

因子	分子质量/kDa	功能
起始因子		
IF-1	9	协助 IF-3 结合
IF-2	97	结合起始 tRNA 和 GTP
IF-3	22	从无活性的核糖体上释放 30S 亚基并帮助 mRNA 结合
延伸因子		
EF-Tu	43	结合氨酰-tRNA 和 GTP
EF-Ts	74	从 EF-Tu 中置换 GDP
EF-G	77	通过 GTP 和核糖体结合促进转位
释放因子		
RF-1	36	识别终止密码子 UAA 和 UAG
RF-2	38	识别终止密码子 UAA 和 UGA
RF-3	46	与 GTP 结合并刺激 RF-1 和 RF-2 的结合

真核生物的起始过程与原核生物相似

真核生物的起始过程,在总体上与原核生物相似,但在细节上有差别。真核生物具有比原核生物更多的起始因子种类(命名为 eIF-n;"e"代表真核的)。其中之一,**eIF-2**,参与了起始反应的第 2 步,和 GTP 及起始 tRNA 形成复合物,并和 mRNA 一起与 40S 核糖体亚基结合。起始 tRNA 是 **Met-tRNA$_i^{Met}$**(这里下标"i"表示起始 tRNA^{Met}),其荷载的 Met 没有像原核生物那样被甲酰化。然而,两种起始 tRNA 在体外情况下很容易互相替换。

真核 mRNA 缺乏以 Shine-Dalgarno 方式结合 18S rRNA 的互补序列。当然,*真核 mRNA(总是单顺反子的)的翻译几乎总是从其第一个 AUG 开始*。由于 **eIF-2** 是一种**帽结合蛋白质**(cap-binding protein),40S 亚基可能结合在(或者靠近)真核 mRNA 的 5′帽子(节 25-3A),并且向下游移动,直至遇到第一个 AUG。这种假设可以解释为什么加帽不合适的 mRNA 翻译起始的速度会大为下降。

873

B. 肽链的延伸

874

核糖体以三个阶段的反应循环延伸多肽链(图 26-28)。这个过程以每秒最快达 40 个残基的速度进行,需要一些被称为**延伸因子**(elongation factor)的非核糖体蛋白参与(表 26-6)。

(1)氨酰-tRNA 的结合

在大肠杆菌延伸循环的"结合"阶段,GTP 和延伸因子 **EF-Tu** 形成的二元复合物和一个氨酰 tRNA 结合,产生的三元复合物与核糖体结合。氨酰-tRNA 在核糖体 A 位点上结合形成密码子-反密码子复合物,并伴随 GTP 水解成 GDP,导致 EF-Tu ·GDP 和 P_i 的释放。当 EF-Tu·GDP 中的 GDP 被延伸因子 **EF-Ts** 置换,而 EF-Ts 转而被 GTP 置换以后,EF-Tu·GTP 就得以再生。

在没有 EF-Tu 的情况下,氨酰-tRNA 也能和核糖体的 A 位点结合,但速度太慢,以至于不能支持细胞的生长。事实上 EF-Tu 是大肠杆菌丰度最高的蛋白质,每个细胞中有约 100 000 个拷贝(超过细胞总蛋白的 5%),这大概是细胞中 tRNA 的数量,这说明了 EF-Tu 的重要性。因而,

875

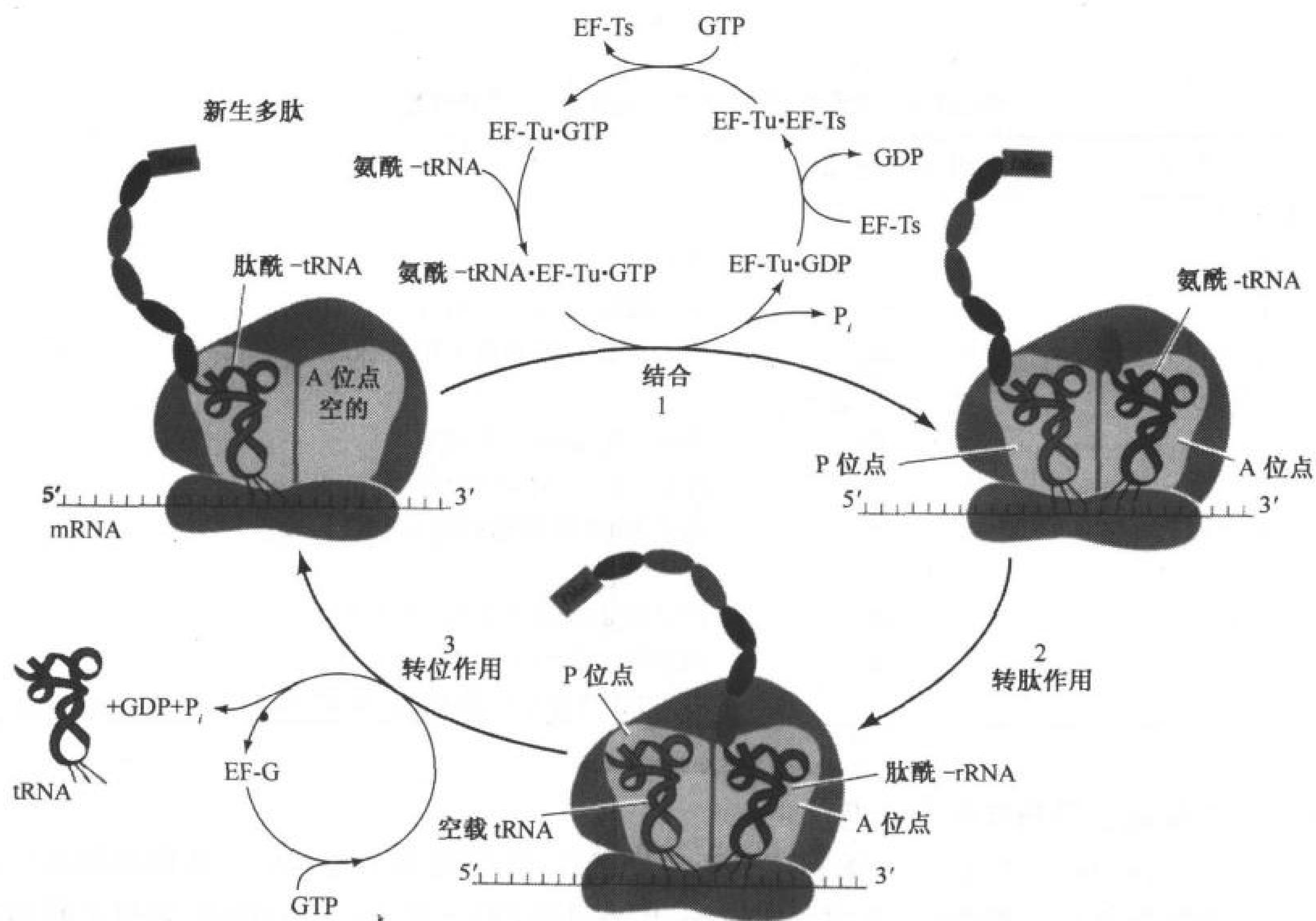
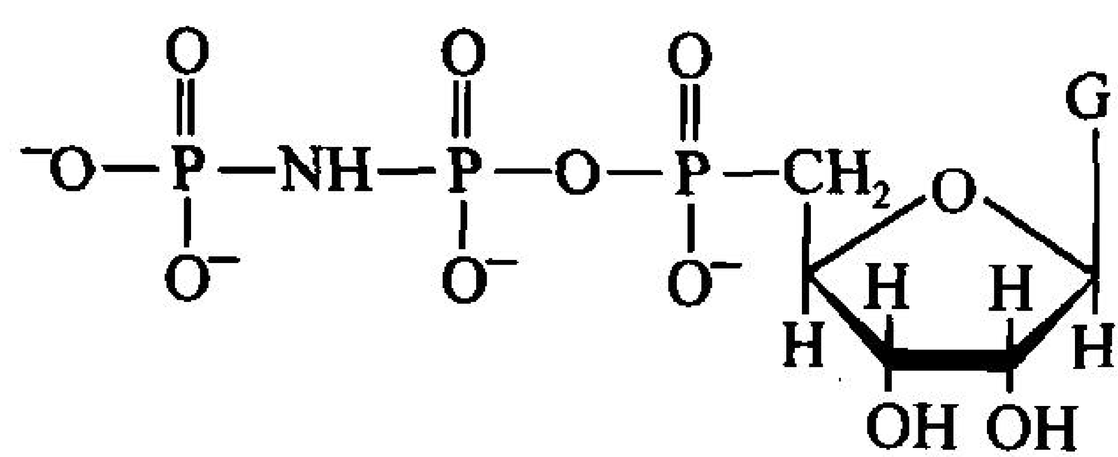


图 26-28 功能的秘诀:大肠杆菌核糖体的延伸循环

E 位点未被显示。真核生物的延伸采用了相似的循环,但 EF-Tu 和 EF-Ts 被单个多亚基蛋白质 eEF-1 所取代,EF-G 被 eEF-2 所代替。



鸟苷-5′-(β, γ-亚氨基)三磷酸(GDPNP)

细胞中全部氨酰-tRNA 基本都被 EF-Tu 占据了。

Morten Kjeldgaard 和 Jens Nyborg 测定了细菌 EF-Tu 和 GDP 以及缓慢水解的 GTP 类似物**鸟苷-5′-(β, γ-亚氨基)三磷酸**(GDPNP)形成的复合物的 X 射线结构。EF-Tu 折叠成三个明显的结构域,其间由柔性的肽段相连。N 端结构域 1 和 GTP/GDP 结合,并催化 GTP 的水解,在结构上和其他已知的 GTP 结合蛋白很相似。比较 GDPNP 和 GDP 复合物(图 26-29)显示,GTP 水解时,EF-Tu 会发生一次重要的结构重组,在此过程中,结构域 1 相对于结构域 2 和 3 的走向改变了约 91°。

876

Phe-$tRNA^{Phe}$·EF-Tu·GDPNP 三元复合物的 X 射线结构显示,两个大分子结合形成一个开塞器形状的复合物,其中 EF-Tu 和 tRNA 的受体臂形成球形把手,而 tRNA 的反密码子螺旋形成开塞器的螺杆。这两个大分子的构象十分类似于在 EF-Tu·GDPNP(图 26-29)和未复合物化的 $tRNA^{Phe}$的 X 射线结构(图 26-66b)中所见的构象。大分子的结合相当精细:Phe-$tRNA^{Phe}$的 3′-CCA-Phe 片段结合于 EF-Tu· GDPNP 的结构域 1 和 2 之间的缝隙中(图 26-30a 的红色和绿色部分);tRNA 的 5′磷酸结合在 EF-Tu 的三个结构域的凹陷连结处;而 tRNA TΨC 臂的一侧与暴露的 EF-Tu 结构域 3 的主链及侧链结合(图 26-30a 的蓝色部分)。据推测,所有各种延伸



图 26-29 核糖体延伸因子 EF-Tu 与 GDP 及 GDPNP 复合物的 X 射线结构的叠加
蛋白质的结构域 1，即和 GTP 结合的结构域，由其 C_α 主链表示，GDP 复合物为紫红色，GDPNP 复合物为红色。结构域 2 和 3 在两种复合物中走向相同，用绿色和青色表示。结合的 GDP 和 GDPNP 用骨架形式表示，黄色代表 C，蓝色 N，红色 O，绿色 P。（引自 Morten Kjeldgaard and Jens Nyborg, Aarhus University Århus, Denmark）

tRNA都与 EF-Tu 有这类接触。

三元复合物的 X 射线结构使人想到为什么 EF-Tu 和除起始 tRNA 以外的所有氨酰-tRNA 结合而不和未荷载的 tRNA 结合。显然，氨酰基和 EF-Tu 的紧密结合大大提高了 EF-Tu 和 tRNA 的亲和力，不然它和 tRNA 的结合是很松散的。延伸 tRNA 的第一对碱基是配对的（如图 26-6a 中 $tRNA^{Phe}$的 G1·C72），而在 $tRNA_f^{Met}$ 中是不配对的（C·A），因此这种起始 tRNA 有一个 5 个核苷酸的 3′端突出，而延伸 tRNA 的突出是 4 个核苷酸，这会产生何种后果？很显然，这一特征加上其荷载的 fMet 残基的甲酰基会阻碍 fMet-$tRNA_f^{Met}$ 与 EF-Tu 的结合，因而解释了为什么起始 tRNA 从不翻译内部 AUG 密码子。

（2）转肽作用

在图 26-28 所示的延伸循环的第 2 阶段中，通过 A 位氨酰-tRNA 3′端连接的氨基亲核置换 P 位的 tRNA（图 26-23）生成了一个肽键。这个反应要求 A 位和 P 位的 tRNA 经排列后其受体臂相互靠近。同样，两个 tRNA 的反密码子也必须以并排方式排列，这样它们就可以和 mRNA 上的连续的密码子结合。

877

冷冻电子显微技术得到的图像显示，3 个 tRNA 结合在核糖体亚基之间的空隙中（图 26-17）。3 个结合位点被称为 A、P 和 E 位点，**E（释放）位点**和失去肽基后的 tRNA 暂时结合。这和核糖体可以至多结合 3 个脱酰基 tRNA，但只能结合 2 个氨酰-tRNA 的观察结果是一致的。注意，*由 mRNA 引导的氨基酸连接生成多肽的反应，要求 A 位和 P 位的 tRNA 的 CCA 末端以及反密码子都处于紧密相邻的位置*。交联及化学足迹研究表明，tRNA 的正确排列除了密码子–反密



图 26-30　EF-Tu·tRNA 及 EF-G 三级结构的比较

(a)EF-Tu 中，结构域 1 为红色，结构域 2 为绿色，结构域 3 为蓝色。酵母 $tRNA^{Phe}$的 tRNA 主干用紫色显示。(b)EF-G 中，结构域 1 为红色，结构域 2 为绿色，额外结构域为深蓝色，而结构域 3、4 和 5 为紫色。在 EF-G 的 X 射线结构中，结构域 1 中的 25 个残基片段是看不见的，并且结构域 3 也不清楚，因而在这个模型中只可看到一些多肽片段。(引自 Jens Nyborg, Aarhus University, Denmark Arhus)

码子的相互作用外，还需要 tRNA 和 16S rRNA 以及 23S rRNA 特定片段之间的配对。

新生的多肽链通过在其 C 末端加上一个残基而得以延长，然后被转移到 A 位的 tRNA 上，这个过程叫做**转肽作用**(transpeptidation)。这个反应的发生不需要像 ATP 这样的激活辅助因子，因为新生多肽和 P 位 tRNA 之间的酯键是一种“高能”键。

23S rRNA 几乎可以肯定参与催化肽键的生成，这个观点来源于以下观察：

1) RNA 可以作为一种催化剂(节 23-2E)；

2) 核糖体主要是由 RNA 组成；

3) 核糖体 RNA 在整个进化进程中比核糖体蛋白保守程度更高；

4) 在为数众多的核糖体蛋白中，任何一种蛋白质的缺失都不会使核糖体失去功能；

5) 大多数抑制蛋白质合成的抗生素的抗性突变，都发生在编码 rRNA，而不是核糖体蛋白的基因中。

事实上，Harry Noller 指出，从嗜热细菌 *Thermus aquaticus* 中得到的 50S 亚基，经去除其约 95%的蛋白质处理后，只要其 RNA 保持完整，仍可保留大于 80%的活性。当然，考虑到核糖体蛋白和 RNA 已经共同进化超过了 35 亿年，即使证明现代肽酰转移酶的活性来自某些核糖体蛋

白和 23S rRNA 的协同作用，也不会令人惊奇。

(3)转位作用

肽键的生成导致新的肽酰-tRNA 的受体末端从 A 位移到 P 位，而其反密码子末端仍位于 A 位点(图 26-31)。先前在 P 位的 tRNA 的受体末端转移到 E 位点，而其反密码子末端仍留在 P 位。这种结构在延伸循环的最后阶段发生，该过程称为**转位**(translocation)。在转位过程中，肽酰-tRNA 和其结合的 RNA 一起整个转移到 P 位点(因而把 A 位空出来)，而没有荷载的 tRNA 则完全转到 E 位点，这为核糖体的下一个延伸循环作好准备。肽酰-tRNA 的密码子-反密码子结合的维持起着"位置保留者"的作用，使核糖体沿着 mRNA 严格以 3 个核苷酸进行转位，从而保证了阅读框。然而，当翻译遇到 mRNA 的同源多聚体片段时，如 poly(U)，就经常会发生"框移作用"，在这种情况下，密码子-反密码子的配对很容易向前或者向后滑动一个核苷酸。

图 26-31 延伸循环中核糖体的结合状态

注意本示意图对图 26-28 所示的经典的延伸循环的详细说明。[部分选自 Moazed, D. and Noller, H.F., Nature 342, 147(1989)]

在大肠杆菌中，转位过程需要一种延伸因子 **EF-G**，它和 GTP 一起与核糖体结合，只有当 GTP 水解成 GDP + P_i 时，才被释放(图 26-28)。在下一次延伸周期开始之前必须释放 EF-G，因为 EF-G 和 EF-Tu 的核糖体结合位点是部分或完全重叠的，因而它们在核糖体上的结合是互相排斥的。转位前 GTP 的水解为 tRNA 的移动提供了自由能。

878

Thomas Steitz 和 Peter Moore 所确定的 EF-G 的 X 射线结构(图 26-30b)显示,这个蛋白质有一个由 5 个结构域组成的细长形状,前两个结构域的排列类似 EF-Tu·GDPNP 复合体中的前两个结构域(图 26-29)。最令人感兴趣的是,EF-G 的余下的 3 个结构域具有使人联想到结合了 EF-Tu 的 tRNA 的构象(图 26-30a)。这种分子拟态产生了这种可能性,即 EF-G 对转位的驱动不仅仅是通过诱发核糖体构象的改变,还可以通过使肽酰-tRNA 从 A 位点主动置换来实现。EF-G 的 3 到 5 结构域和 tRNA 的结构相似性也提示,在最古老的细胞中,细胞功能是建立在 RNA 的基础上的,蛋白质可能通过模拟已经在 RNA 上使用得很成功的形状而进化。

tRNA 和核糖体 A 位和 E 位的结合显示出负变构协同性。在一个延伸循环的后期,E 位点和新的脱酰基 tRNA 能以高亲和性结合,而此时空着的 A 位点对氨酰-tRNA 有较低的亲和性。

879

一个新的氨酰-tRNA·EF-Tu·GTP 复合体的到来可以诱导核糖体发生构象改变,从而使 A 位点转变为高亲和性状态,而 E 位点转变为低亲和性状态。这样,GTP 水解蛋白 EF-Tu 和 EF-G 的交替活性,通过翻译过程的转肽和转位,保证了核糖体的单向循环。

类似于原核生物的真核生物的延伸循环

真核生物的延伸循环十分类似于原核生物。在真核生物中,EF-Tu 和 EF-Ts 的功能由真核延伸因子 eEF-1 的两个不同的亚基担任。同样地,eEF-2 以类似于原核 EF-G 的方式行使功能。然而,真核生物和原核生物相对应的延伸因子是不能互换的。eEF-2 是白喉毒素灭活的专一性靶蛋白(见框 26-3)。

框 26-3 健康和疾病的生物化学

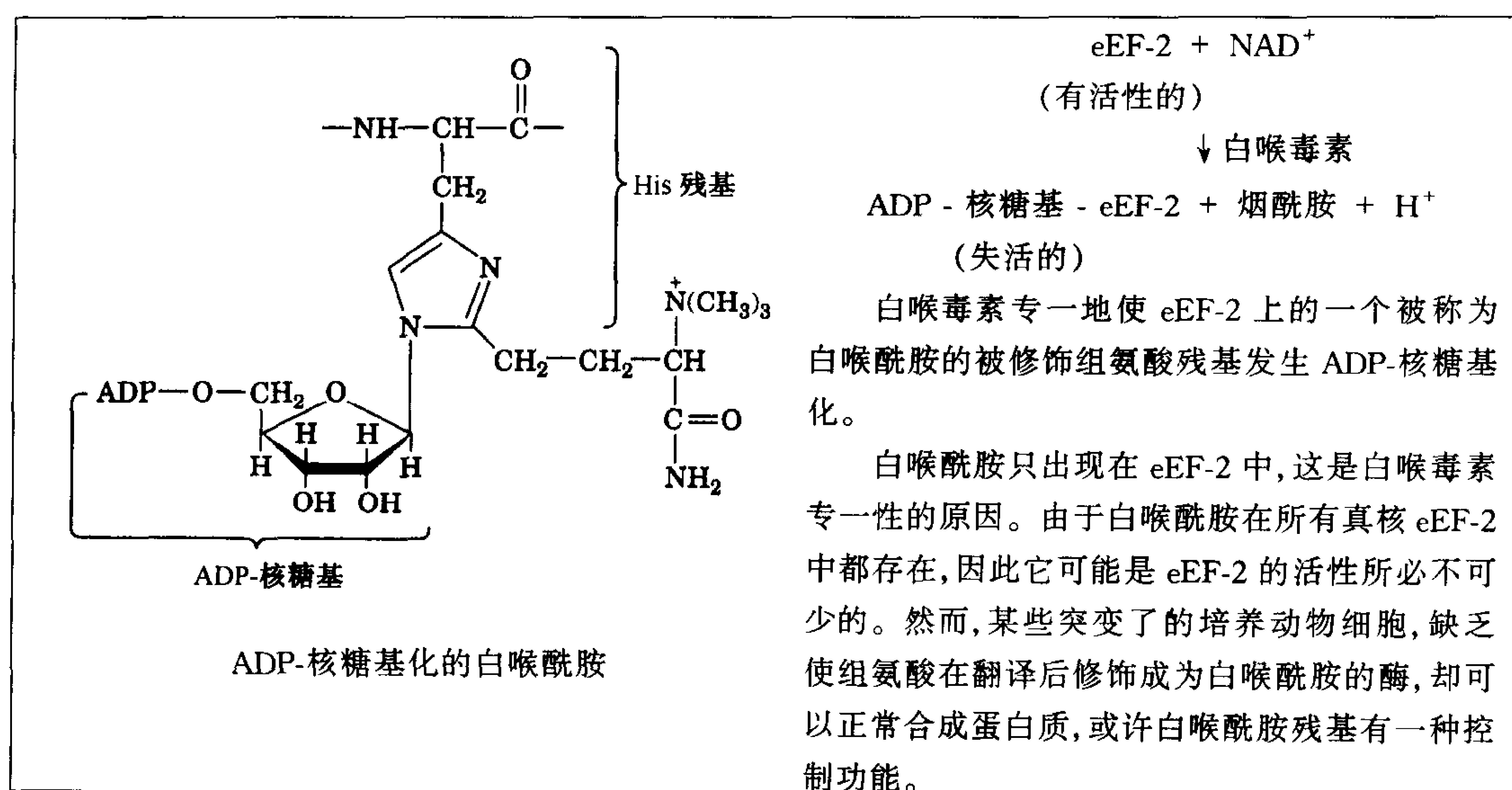
白喉毒素使 eEF-2 失活

白喉是一种由白喉杆菌(*Corynebacterium diphtheria*)感染引起的疾病,这种细菌是杆状菌噬菌体(corynephage)β 的宿主。直到 19 世纪 20 年代末期,白喉仍然是儿童死亡的首要原因,之后,免疫接种变得普遍起来。尽管细菌感染通常局限于上呼吸道,但细菌分泌一种由噬菌体编码的称为白喉毒素的蛋白质,这种蛋白质是该疾病致命的罪魁祸首。白喉毒素可以专一性地使真核延伸因子 eEF-2 失活。

在 1880 年发明了类毒素(即甲醛灭活的毒素)之后,白喉的致病作用才可通过用类毒素免疫被防止。患白喉的病人也可用抗毒素马血清(这种马血清可以与白喉毒素结合,并使之失活)治疗,同时结合使用抗生素对抗此细菌的感染。

白喉毒素是一种有 535 个残基的单体蛋白,很容易被类胰蛋白酶切割产生两个由二硫键相连的片段 A 和 B。B 片段可以和易感细胞的膜上的专一性受体结合,从而通过受体介导的内吞作用促使 A 片段进入胞质。然后,胞内的还原性环境使得连接 A 和 B 片段的二硫键断裂。

在胞质中,A 片段催化 NAD^+ 参与的 eEF-2 的 ADP-核糖基化反应,使这个延伸因子失活(这个反应类似于由霍乱毒素催化的反应;框 21-1)。由于 A 片段以催化方式发挥作用,因此一个分子就足以使一个细胞中的所有 eEF-2 的 ADP-核糖基化,这将阻止蛋白质的合成,从而杀死细胞。因此,只要有几微克的白喉毒素,就足以杀死一个未经免疫接种的个体。



ADP-核糖基化的白喉酰胺

白喉毒素专一地使 eEF-2 上的一个被称为白喉酰胺的被修饰组氨酸残基发生 ADP-核糖基化。

白喉酰胺只出现在 eEF-2 中，这是白喉毒素专一性的原因。由于白喉酰胺在所有真核 eEF-2 中都存在，因此它可能是 eEF-2 的活性所必不可少的。然而，某些突变了的培养动物细胞，缺乏使组氨酸在翻译后修饰成为白喉酰胺的酶，却可以正常合成蛋白质，或许白喉酰胺残基有一种控制功能。

C. 肽链的终止

880

在合成的 mRNA 如 poly(U)指导下的多肽合成，会使氨酰-tRNA 被阻塞在核糖体中。然而，含有终止密码子 UAA、UGA 或 UAG 的天然 mRNA 的翻译可以生成自由的多肽。在大肠杆菌中，终止密码子通常没有相应的 tRNA，它们由蛋白质**释放因子**(release factor)(表 26-6)所识别：**RF-1** 识别 UAA 和 UAG，而 **RF-2** 识别 UAA 和 UGA。第 3 种释放因子 RF-3 是一种和 GTP 形成复合体的 GTP 结合蛋白，可以促进核糖体与 RF-1 和 RF-2 的结合(图 26-32)。在真核生物中，一种释放因子 **eRF** 识别所有 3 种终止密码子。

释放因子而不是氨酰-tRNA 和终止密码子的结合，可以诱导核糖体肽酰转移酶把肽基转移到水分子上。反应的产物是从核糖体上解离下来一个自由的多肽和一个空载的 tRNA。释放因子被逐出核糖体，同时伴随着与 RF-3 结合的 GTP 经水解生成 GDP + P_i。真核 eRF 也与 GTP 结合，通过 GTP 水解以类似的方式从核糖体中被释放出来。然后，产生的无活性的核糖体必须释放其结合的 mRNA，才能开始新一轮多肽的合成。

无义抑制基因阻止终止

一种被称为**无义突变**(nonsense mutation)的突变，使编码氨酰基的密码子转变为终止密码子，并导致翻译的过早终止。有这种突变的生物，可以被发生在 tRNA 基因上的第 2 次突变所“拯救”，后者使得 tRNA 可以识别无义密码子。这种**无义抑制**(nonsense suppressor)tRNA 和其野生型祖先一样，携带同样的氨基酸，并在终止密码子处把氨基酸接到生长着的多肽上，因而阻止了链的终止。例如，大家知道的大肠杆菌**琥珀型抑制基因** *su*3 是一种 $tRNA^{Tyr}$，其反密码子已经从野生型的 GUA(解读 Tyr 密码子 UAU 和 UAC)突变为 CUA(识别琥珀型终止密码子 UAG)。在 $su3^+$ 大肠杆菌中，如果一个编码必需蛋白质的基因中有一个原本是致命的琥珀型突变，而野生型的氨基酸残基被 Tyr 取代不会使蛋白质失活，那么这种细菌就可以存活。

细胞是如何承受一种既消除了一种正常的 tRNA，同时又阻止多肽合成终止的突变的呢？

细胞得以存活,是由于突变了的 tRNA 往往是一组同功 tRNA 中的一个少数成员,而且无义抑制 tRNA 必须和释放因子竞争结合终止密码子。因此,许多被抑制基因挽救的突变体的生长比野生型细胞要缓慢得多。

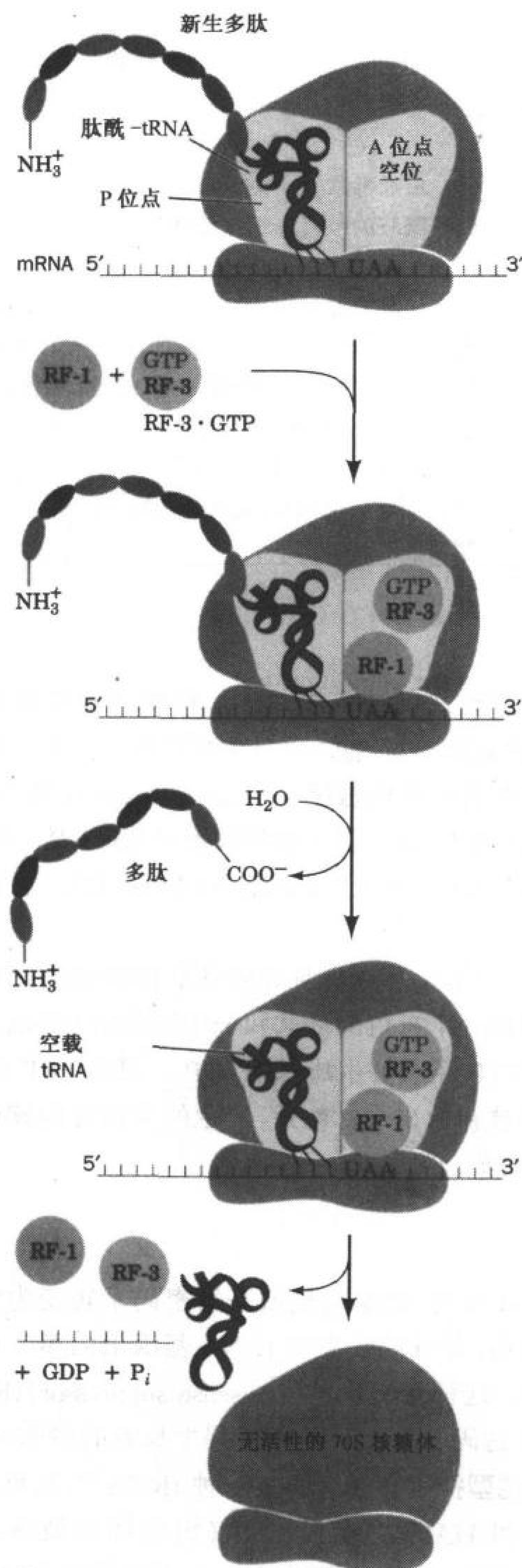


图 26-32 大肠杆菌核糖体的翻译终止途径

RF-1 识别终止密码子 UAA 和 UAG,而 RF-2 识别 UAA 和 UGA。

881

GTP 水解加快了核糖体的处理过程

由诸多 GTP 结合因子(大肠杆菌中的 IF-2, EF-Tu, EF-G 和 RF-3)介导的 GTP 水解反应的作用是什么?哪一种作用是正常核糖体功能所必需的?尽管极慢,但转位作用可以在没有 GTP 存在的情况下发生,因此,转肽反应的自由能已足以驱动整个翻译过程。此外,没有一个 GTP 水解反应像在众多生物合成反应中的 ATP 水解那样生成一种"高能"共价中间产物。因此有人认为,核糖体和 GTP 结合蛋白与 GTP 复合物结合后,以变构方式导致核糖体组分构象的改变,从而促进了某一特定过程,如转位的进行(如图 26-29)。这种构象变化也催化 GTP 水解,后者转而使核糖体恢复到其初始的构象,同时伴随着产物的释放,包括 GDP 和 P_i。因此,GTP 水解反应的高速率和不可逆性,保证了各种复杂的核糖体偶联的过程,如肽链的起始、延伸和终止,自身可以快速而不可逆地进行。GTP 的水解还有助于翻译的准确性(见下文)。

D. 翻译的准确性

核糖体以很高的保真度翻译 mRNA,其在多肽中掺入错误氨基酸的概率只有约 10^{-4} 每个残基(有些抗生素是通过增加错误掺入氨基酸的概率起作用的,见框 26-4)。核糖体选择氨酰-tRNA 仅仅是根据其反密码子。在密码子-反密码子相互作用中,由一个

碱基的错配造成的结合能的损失据估计约为 $12kJ\cdot mol^{-1}$,这不能解释核糖体解码精度低于约 10^{-2} 每个密码子的错误率。显然,核糖体有一些类似于校对的机制来提高其解码的总体准确性。

氨酰-tRNA 合成酶(节 26-2B),通过一种选择性结合机制来提高其可靠性。然而在核糖体中还没有发现这种机制的证据。的确,多数证据显示核糖体通过一种**动力学校对**(kinetic proofreading)机制排斥不恰当的密码子-反密码子相互作用。John Hopfield 提出,这一过程是按以下步骤进行的(图 26-33)。

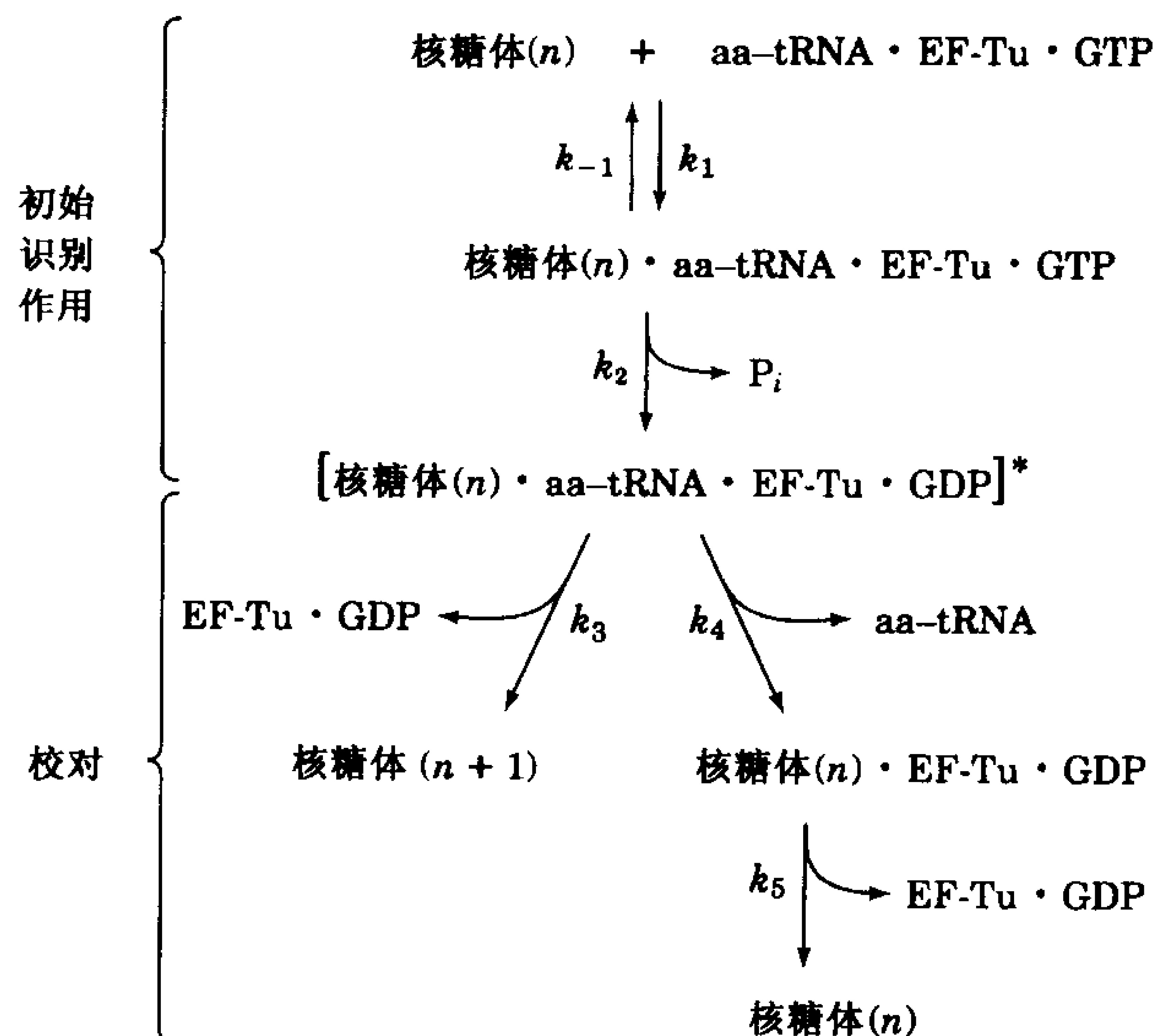


图 26-33 一种正确选择密码子-反密码子相互作用的动力学校对机制

起始识别反应筛选氨酰-tRNA(aa-tRNA)正确的密码子-反密码子相互作用。形成的中间体在 GTP 水解驱动过程下转变为一种高能中间体(*),后者或者在形成肽键之前释放 EF-Tu·GDP,或者在 EF-Tu·GDP 释放之前释放氨酰-tRNA。如果错配的密码子-反密码子相互作用的 k_4/k_3 大于正确配对的情况,那么这些后面的步骤就组成了检查正确的 tRNA 结合的一种校对机制。

1)起始结合反应可以根据其密码子-反密码子结合能量来区分对应的(专一的)和非对应的(非专一的)tRNA。

2)接着,和 EF-Tu 结合的 GTP 不可逆地水解,产生一种活化的中间体(图 26-33 中以星号表示)。然后这个复合体可以用两条途径中的一种反应:

(a) EF-Tu·GDP 以速率常数 k_3 从核糖体中解离出来,从而致使核糖体生成一个肽键;

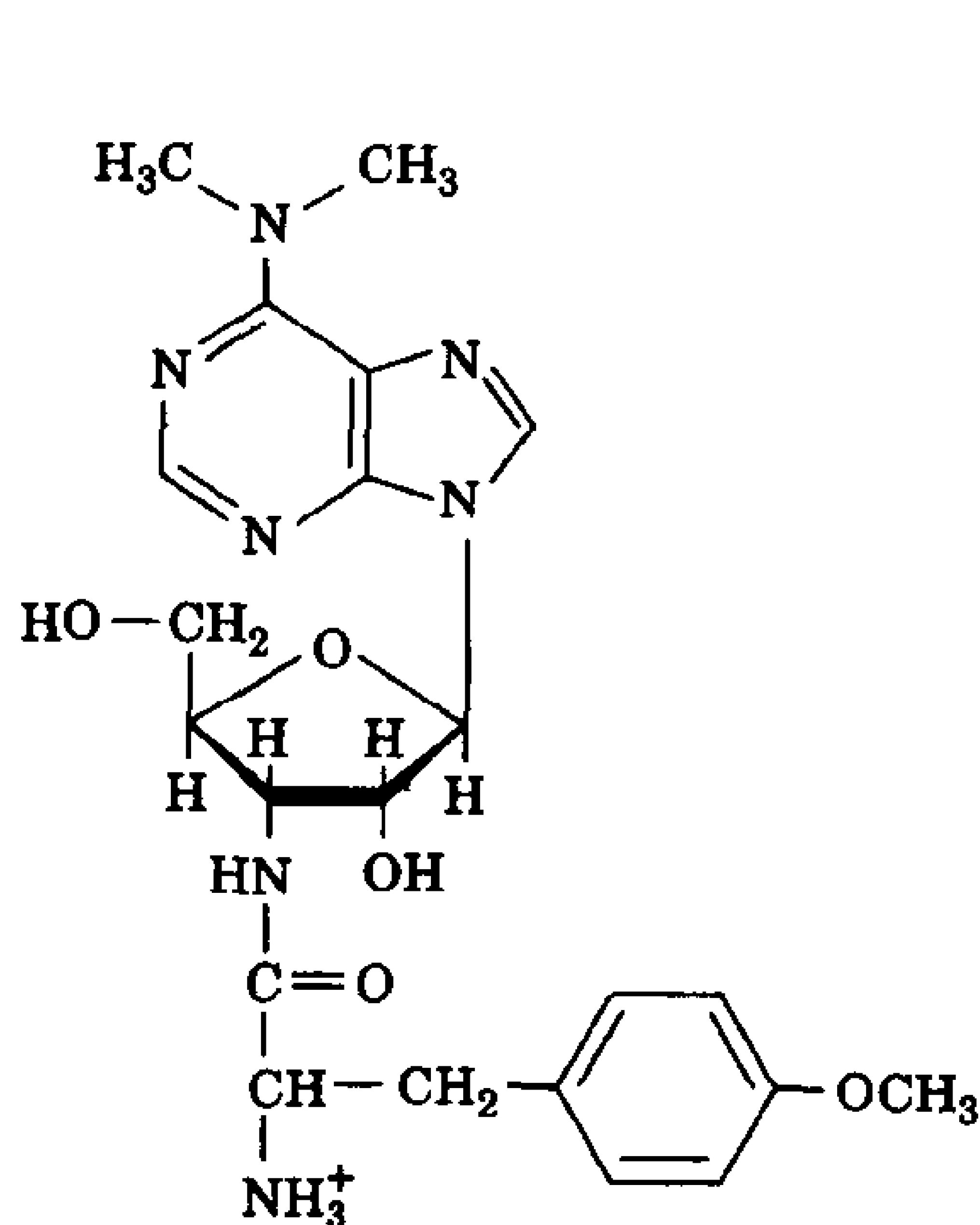
(b) 或者氨酰-tRNA 以速率常数 k_4 从核糖体中解离出来,从而使延伸步骤流产。随后 EF-Tu·GDP 从核糖体中解离出来,使其可以再度起始延伸步骤。

如果非对应 tRNA 的 k_4/k_3 比对应 tRNA 的高,则第 2 次筛选就会发生。有人认为这种第 2 次筛选的物理基础是 k_3 与 tRNA 的性质无关,而 k_4 对相对结合较弱的非对应 tRNA 来说要大于对应的 tRNA。因此,非对应 tRNA 常常在 EF-Tu·GDP 解离之前就从核糖体上解离下来,而对应 tRNA 通常保持结合状态。对这个过程来说,形成活化的中间体是必需的,不然的话其 tRNA 的解离步骤(以 k_4 为特征)就会和起始识别步骤(以 k_{-1} 为特征)一样。因此,GTP 就成为动力学校对的代价。

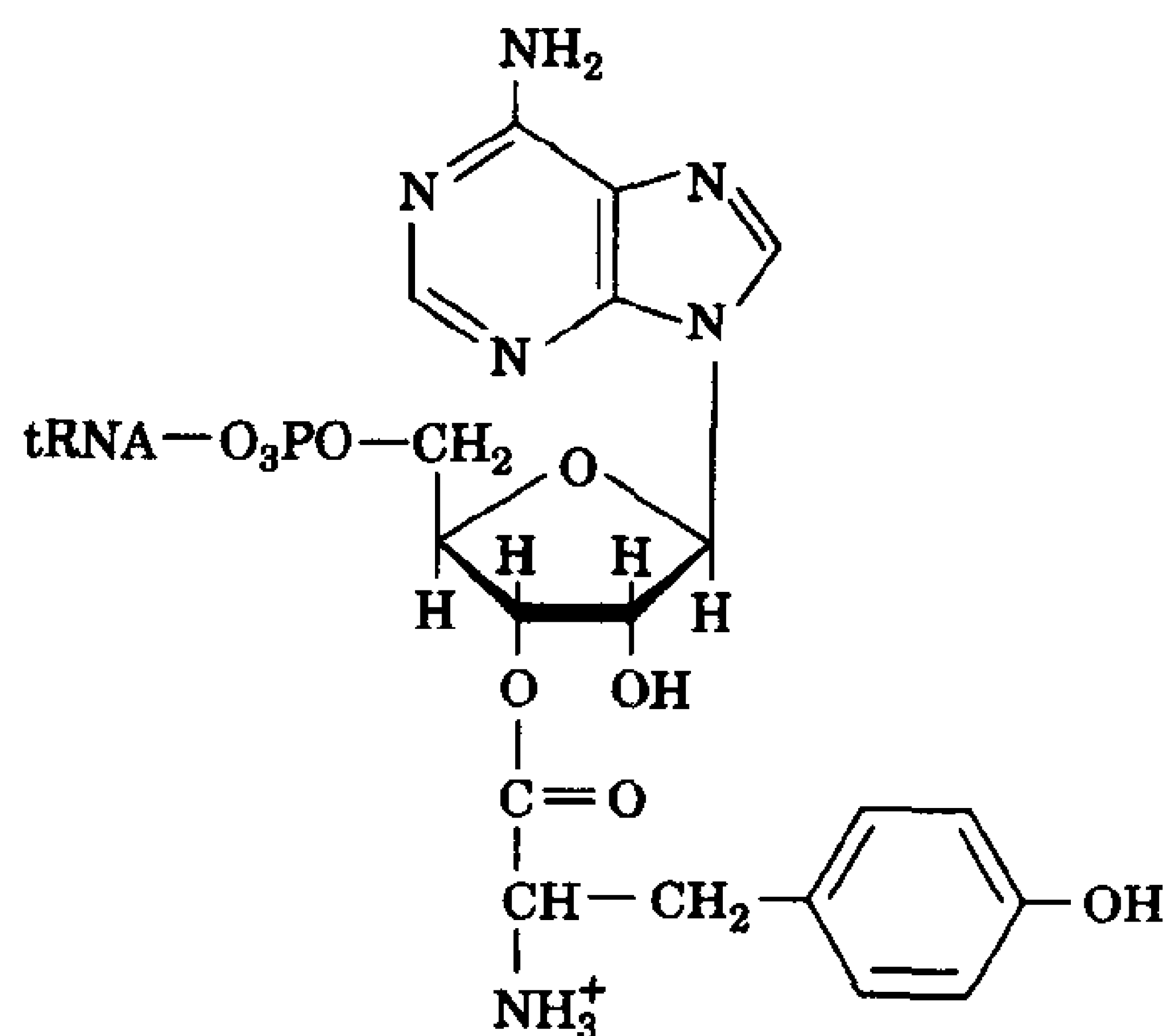
框 26-4 健康和疾病的生物化学

抗生素对蛋白质合成的影响

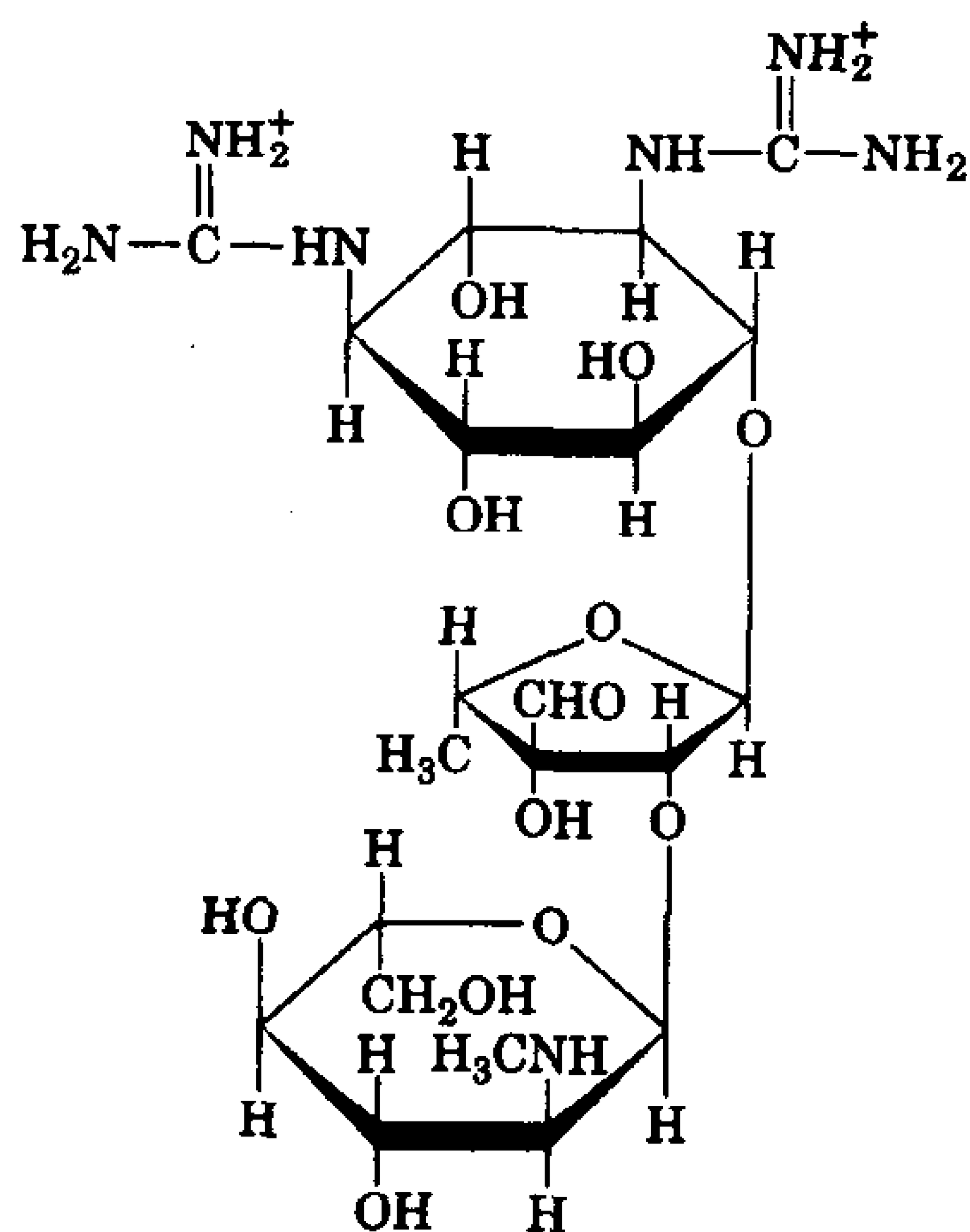
绝大多数已知的抗生素,包括大量医学上有用的抗生素,都可以阻断翻译。这种情况大概是由于翻译机制高度复杂的结果,这种复杂性使得它很容易在多种情况下受到破坏。抗生素也一直对分析核糖体的机制很有用处,因为对一个特定功能的阻断,常常使得这种功能在生化上分解成它的组成步骤成为可能。例如,核糖体的延伸循环,最初就是通过使用嘌呤霉素来进行研究的,这种抗生素类似于 Tyr-tRNA 的 3′末端。



嘌呤霉素



酪氨酰-tRNA

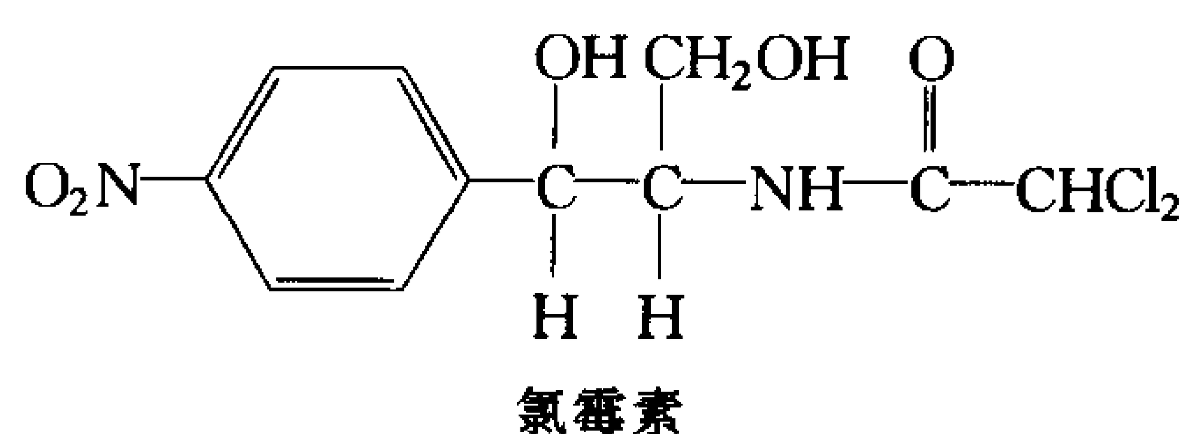


链霉素

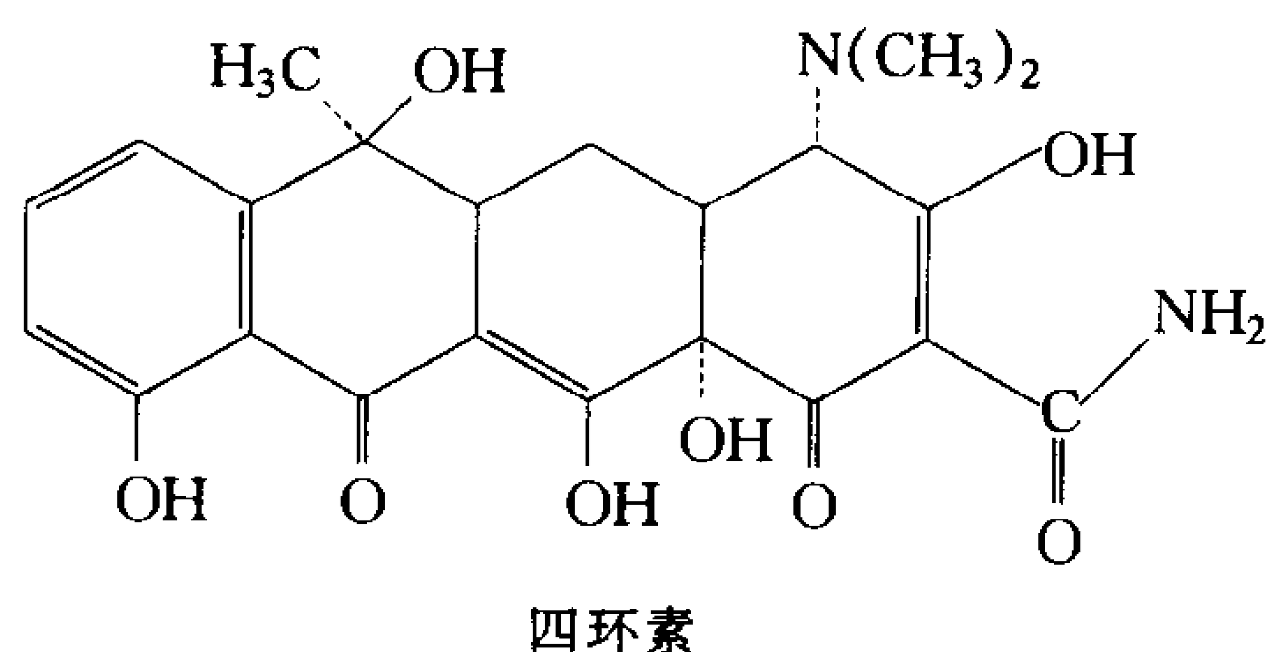
嘌呤霉素不需要延伸因子就可以和核糖体的 A 位点结合。转肽反应产生一个肽基-嘌呤霉素,其中嘌呤霉素的"氨基酸残基"是通过一个酰胺键而不是酯键与其"tRNA"相连的。因此,核糖体就不能催化进一步的转肽,而多肽的合成也就流产了。

链霉素在医学上很重要,是被称为氨基糖苷类抗生素家族的成员,可以以多种方式抑制原核生物的核糖体。在低浓度的情况下,链霉素可以诱导核糖体特征性地错误解读 mRNA:在密码子的第一和第二位的一种嘌呤可能被错读为另一种嘌呤,而处于第一位的任何一种嘧啶可能被错读成腺嘌呤。这会抑制易感细胞的生长,而不会杀死它们。然而在高浓度的情况下,链霉素可以阻止链的正常起始,从而导致细胞死亡。

氯霉素是第一个"广谱"抗生素，可以抑制原核生物核糖体肽基转移酶的活性。然而，氯霉素由于其毒副作用，在临床上只限用于严重感染。这种毒副作用部分是由线粒体核糖体对氯霉素的敏感性引起的。氯霉素看来在A位点附近与大亚基结合，因为它和嘌呤霉素竞争与氨酰-tRNA的3′末端结合，但和肽酰-tRNA不发生竞争。



氯霉素



四环素

四环素及其衍生物是广谱抗生素，可以与原核生物核糖体的小亚基结合，并抑制氨酰-tRNA的结合。四环素还可以通过抑制ppGpp的合成而阻断严谨反应(节26-3)。这表明肽酰-tRNA必须和A位点结合，以诱导应急因子的产生。

四环素抗性菌株已经变得非常常见，因而带来了一系列严重的医疗问题。最常见的抗性是由于细菌细胞膜对四环素的通透性降低造成的，而不是因为核糖体组分的任何改变，这种改变可以克服对翻译的抑制作用。

蛋白质可能被翻译后修饰

882

一条多肽即使在被完全合成出来之前，就已经开始呈现其成熟的构象。蛋白质折叠在最初的30～40个残基被连接在一起时就开始了，此刻多肽链开始从核糖体中显露出来。分子伴侣(节6-4C)可能与新合成的多肽结合，并促进它们折叠以及和其他亚基的结合。除此之外，许多蛋白质会发生**翻译后修饰**(posttranslational modification)，包括去除特定的残基和(或)对特定残基衍生化。例如，起始Met或fMet就常常被切除掉。以非活性的前体形式合成出来的蛋白质，其活化也需要限制性蛋白水解作用，这种前体被称为**原蛋白**(proprotein)。丝氨酸蛋白酶(节11-5D)的酶原就是以这种方式被激活的。被转运到内质网中准备从细胞中输出的蛋白质，典型地含有一段信号肽，这段信号肽是必须被切除的(节10-2D)。带有一段信号肽的蛋白质被称为**前蛋白**(preprotein)，假如在其成熟过程中还要发生额外的蛋白水解作用，则被称为**前原蛋白**(preproprotein)。

其他常见的翻译后修饰有胶原蛋白中Pro和Lys残基的羟基化(节6-1C)、磷酸化和糖基化(节8-3C和节15-5)。已知有150种以上不同类型的侧链修饰，这些修饰涉及除Ala、Gly、Ile、Leu、Met和Val侧链之外的所有侧链。这些修饰的功能是各种各样的，并且在许多情况下还是个谜。

小　　结

1. 核酸序列以遗传密码的形式被翻译成氨基酸序列，而遗传密码是由不重叠的三核苷酸密码子组成的，并且由蛋白质合成机器按顺序解读。
2. 标准的64个密码子的遗传密码包括许多同义密码子、3种终止密码子以及起始密码子。
3. 所有的tRNA有为数众多的化学修饰的碱基，并且都有一个由受体臂、D臂、TΨC臂、反密码子臂和可变臂构成的类似三叶草形状的二级结构。tRNA的三维结构也很相似，由堆集相互作用和非Waston-Crick氢键形式

的交联所维持。

4. 氨酰-tRNA 合成酶(aaRS)催化依赖于 ATP 的、把氨基酸接到适当的 tRNA 上的反应。I 类和 II 类 aaRS 在它们的结构、tRNA 识别的方式及其氨酰化作用的位点上都有差别。对 tRNA-aaRS 相互作用而言,受体臂和反密码子环是共同的识别元件。校对提高了氨酰化的可靠性。
5. 在 mRNA 密码子及 tRNA 反密码子之间第 3 位的摇摆配对,是许多遗传密码简并性的原因。在同一物种中,偏爱的密码子是和每组同功 tRNA 中丰度最高的种类相对应的。
6. 核糖体是由一些 RNA 分子和为数众多的蛋白质构成的大复合体。它们按照所结合的 mRNA 的密码子序列,催化新进入的氨酰-tRNA 和携带着生长中的多肽的 tRNA(肽酰-tRNA)之间肽键的生成。核糖体蛋白和 RNA 自我装配形成 2 个具有高度不规则结构的不同的亚基,小亚基(在大肠杆菌中为 30S,在大鼠的肝脏中为 40S)和大亚基(在大肠杆菌中为 50S,在大鼠肝脏中为 60S)两者结合形成核糖体(在大肠杆菌中为 70S,在大鼠肝脏中为 80S)。
7. 多肽是从 N 端向 C 端合成的。多个核糖体结合在单个 mRNA 上构成了多聚核糖体。在原核生物中,转录和翻译是同时进行的。
8. 翻译可以分为起始、延伸和终止 3 个时相,每个时相都需要有专一的翻译因子的参与,这些因子的作用是由 GTP 水解所驱动的。翻译起始需要有一个接载 fMet(原核生物)或者 Met(真核生物)的起始 tRNA。核糖体亚基和起始 tRNA、起始因子及 GTP 的复合物,以及 mRNA 组装在一起。在原核生物中,mRNA 起始位点的选择,是通过 mRNA 上的 Shine-Dalgarno 序列与 16S rRNA 上的互补序列的结合来实现的。
9. 在多肽链的延伸过程中,氨酰-tRNA 和 GTP 结合延伸因子构成的复合物,进入核糖体的 A 位点。在 rRNA 催化的转肽反应中,氨基攻击位于核糖体 P 位的 tRNA 的肽酰基的酯结合位点。新的肽酰-tRNA 从 A 位转位到 P 位,而脱酰基 tRNA 则从 P 位转位到原先空着的 E 位点,以便为另一轮延伸反应作准备。
10. 翻译的终止,需要识别终止密码子的释放因子。
11. 蛋白质翻译的准确性,通过翻译过程中密码子-反密码子结合步骤的动力学校对得到提高。翻译的多肽产物,可能通过蛋白水解或者衍生化作用被修饰。

参考文献

遗传密码及 tRNA

Arnaz, J.G. and Moras, D., Structural and functional considerations of the aminoacylation reaction, *Trends Biochem. Sci.* **22,** 211–216 (1997).

Björk, G.R., Ericson, J.U., Gustafsson, C.E.D., Hagervall, T.G., Jösson, Y.H., and Wikström, P.M., Transfer RNA modification, *Annu. Rev. Biochem.* **56,** 263–287 (1987).

Cusack, S., Aminoacyl-tRNA synthetases, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7,** 881–889 (1997). [Summarizes the features of 14 known aaRS structures.]

Fox, T.D., Natural variation in the genetic code. *Annu. Rev. Genet.* **21,** 67–91 (1987).

Jiminez-Sanchez, A., On the origin and evolution of the genetic code, *J. Mol. Evol.* **41,** 712–716 (1995).

Judson, J.F., *The Eighth Day of Creation,* Part II, Simon & Schuster (1979). [A fascinating historical narrative on the elucidation of the genetic code.]

Saks, M.E., Sampson, J.R., and Abelson, J.N., The transfer identity problem: a search for rules, *Science* **263,** 191–197 (1994). [Discusses the determinants of specificity in aminoacyl–tRNA synthetases.]

Stadtman, T.C., Selenocysteine, *Annu. Rev. Biochem.* **65,** 83–100 (1996).

核糖体结构及功能

Abel, K. and Jurnak, F., A complex profile of protein elongation: translating chemical energy into molecular movement, *Structure* **4,** 229–238 (1996).

Agrawal, R.K., Penczek, P., Grassucci, R.A., Li, Y., Leith, A., Nierhaus, K.H., and Frank, J., Direct visualization of A-, P-, and E-site transfer RNAs in the *Escherichia coli* ribosome, *Science* **271,** 1000–1002 (1996).

Ban, N., Freeborn, B., Nissen, P., Penczek, P., Grassucci, R.A., Sweet, R., Frank, J., Moore, P.B., and Steitz, T.A., The 9 Å resolution X-ray crystallographic map of the large ribosomal subunit, *Cell* **93,** 1105–1115 (1998).

Burgess, S.M. and Guthrie, C., Beat the clock: paradigms for NTPases in the maintenance of biological fidelity, *Trends Biochem. Sci.* **18,** 381–390 (1993). [Discusses kinetic proofreading.]

Clark, B.F.C. and Nyborg, J., The ternary complex of EF-Tu and its role in protein biosynthesis, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7,** 110–116 (1997).

Frank, J., The ribosome at higher resolution—the donut takes shape, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **7,** 266–272 (1997).

Green, R. and Noller, H.F., Ribosomes and translation, *Annu. Rev. Biochem.* **66,** 679–716 (1997).

Gualerzi, C.O. and Pon, C.L., Initiation of mRNA translation in prokaryotes, *Biochemistry* **29,** 5881–5889 (1990).

Moore, P.B., The three-dimensional structure of the ribosome and its components, *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **27,** 35–58 (1998).

Stansfield, I., Jones, K.M., and Tuite, M.F., The end is in sight: terminating translation in eukaryotes, *Trends Biochem. Sci.* **201,** 489–491 (1995).

Woodson, S.A. and Leontis, N.B., Structure and dynamics of ribosomal RNA, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8,** 254–300 (1998).

关　键　词

遗传密码　genetic code
简并性　degenerate
抑制基因(因子)　suppressor
读框　reading frame
移码突变　frameshift mutation
密码子　codon
反密码子　anticodon
同义密码子　synonym
终止密码子　stop codon
受体臂　acceptor stem
D 臂　D arm
反密码子臂　anticodon arm
TΨC 臂　TΨC arm
可变臂　variable arm
氨酰-tRNA 合成酶　aaRS
氨酰-tRNA　aminoacyl-tRNA
同功 tRNA　isoaccepting-tRNA
摇摆假说　wobble hypothesis
肽酰-tRNA　peptidyl-tRNA
冷冻电子显微镜　cryoelectron microscopy
亲和标记　affinity labeling
RNA 识别模体　RRM
严谨反应　stringent response
肽酰基转移酶　peptidyl transferase
A 位点　A site
P 位点　P site
E 位点　E site
多聚核糖体　polysome
甲酰甲硫氨酸　fMet
Shine-Dalgarno 序列　Shine-Dalgarno sequence
起始因子　initiation factor
延伸因子　elongation factor
释放因子　release factor
转肽作用　transpeptidation
转位作用　translocation
无义(突变)抑制基因　nonsense suppressor
动力学校对　kinetic proofreading
翻译后修饰　posttranslational modification
原蛋白　proprotein
前蛋白　preprotein
前原蛋白　preproprotein

学习思考题

1. 列出复制、转录和翻译之间在总体上的相似性和差别。
2. 解释密码子必须至少由 3 个核苷酸组成的原因。
3. 试述 tRNA 主要的结构特征。
4. 归纳 I 类和 II 类氨酰-tRNA 合成酶之间的不同。
5. 试述提高翻译的可靠性的校对机制。
6. 试述核糖体中 3 个 tRNA 结合位点的功能。
7. 归纳起始、延伸和释放因子在翻译中的作用。
8. 核糖体功能的哪些方面需要自由能的输入?

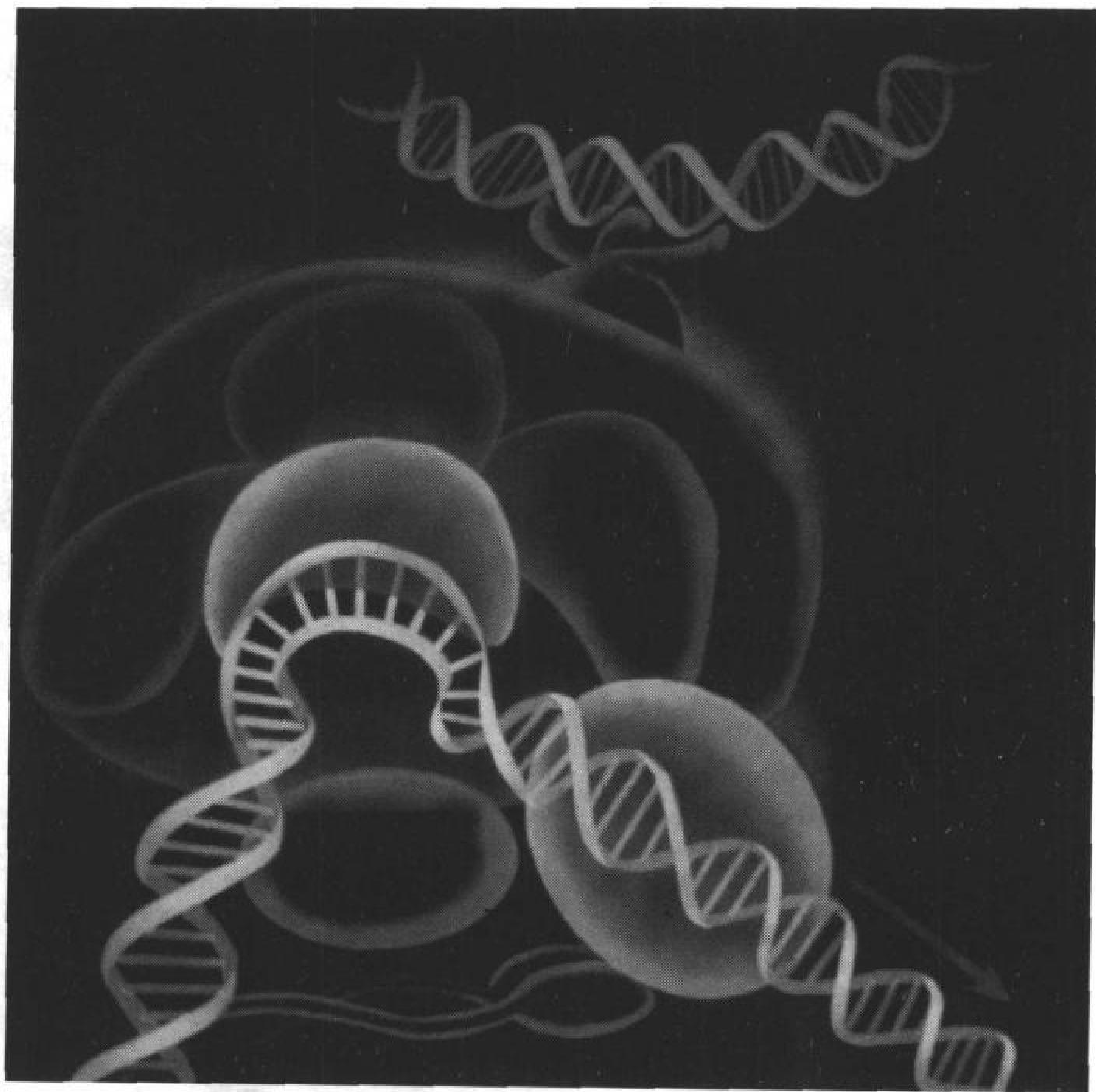
练　习　题

1. 一个编码蛋白质的基因,由于插入一段 4 个核苷酸序列而被破坏的功能,是否可被一个核苷酸的缺失所恢复? 解释原因。
2. 列出一段含有 U 和 G 的随机多核苷酸序列中所有可能的密码子。这种 RNA 编码何种氨基酸?
3. 编码哪些氨基酸的密码子可以由一个单点突变而转变成琥珀型密码子?

4. 解释为什么一种特定的 mRNA 的翻译可以被一段与其互补的所谓反义 RNA 的序列所抑制。
5. TyrRS 通过与 Tyr-OH 基团形成一个特异的氢键来选择其靶氨基酸。为什么不需要一个独立的校对功能来防止 Phe-$tRNA^{Tyr}$的形成？
6. 解释诸如 fMet-Leu-Phe 之类的肽"激活"哺乳类白细胞吞噬(吞食颗粒)功能的现象的意义。
7. 在一个大肠杆菌的无细胞蛋白质合成体系中，最低限度必须保留多少种大分子？把每种核糖体组分看作一种不同的大分子。
8. 解释为什么原核生物的核糖体可以翻译一个圆环形的 mRNA，而真核生物的核糖体即使在所需的协同因子存在的情况下，通常也不能如此。
9. 以 ATP 为计量，计算大肠杆菌从自由的氨基酸合成一段 100 个残基的蛋白质所需的自由能(假定不发生核糖体校对)。
10. 设计一段含有必需的原核控制位点的编码 8 肽 Lys-Pro-Ala-Gly-Thr-Glu-Asn-Ser 的 mRNA。
11. 一段双链病毒 DNA 片段，其中一条链如下所示，编码两个肽，叫做 *vir*-1 和 *vir*-2。把这段双链 DNA 片段加入到体外转录和翻译体系中，可以产生一个 10 个残基的肽(vir-1)和一个 5 个残基的肽(vir-2)。
    AGATCGGATGCTCAACTATATGTGATTAACAGAGCATGCGGCATAAATCT
    (a) 辨识编码每个肽的 DNA 序列。
    (b) 确定每个肽的氨基酸序列。
    (c) 在一个病毒突变株中，23 位的 T 被 G 所取代。确定突变病毒编码的两种肽的氨基酸序列。
    [练习题由 Bruce Wightman, Muhlenberg College, 提供。]
12. 下面所示的是一个哺乳类基因的有义链的序列，确定成熟 RNA 及所编码的蛋白质的序列。假定转录从 TATAAT 序列下游约 25bp 处起始，每个 5′拼接位点具有 AG/GUAAGU 序列，而 3′拼接位点具有 AGG/N 序列，其中 N 代表 4 种 RNA 碱基的任何一种，/表示拼接位点。
    TATAATACGCGCAATACAATCTACAGCTTCGCGTAAATCGTAGGTAAGTTGT
    AATAAATATAAGTGAGTATGATAGGGCTTTGGACCGATAGATGCGACCCTGG
    AGGTAAGTATAGATAATTAAGCACAGGCATGCAGGGATATCCTCCAAATAGGT
    AAGTAACCTTACGGTCAATTAATTAGGCAGTAGATGAATAAACGATATCGATC
    GGTTAGGTAAGTCTGAT
    (练习题由 Bruce Wightman, Muhlenberg College, 提供。]

(南京大学 张敏跃 译)

第 27 章　基因表达调控



遗传信息的受控表达需要很多因子与 DNA 的特异或非特异性相互作用。这幅图中描绘的是转录因子正处在前体复合物中。这种复合物在真核细胞中一旦形成，必然导致 DNA 转录成 mRNA。（引自©Irving Geis）

887 DNA 的保守复制确保同一细胞的子代具有同样的遗传信息。不过如何读取这些遗传信息会导致细胞和它们的父代出现差异，这种差异有时是显著的。一个细胞或生物体的遗传信息**表达**(expression)，也就是从 DNA 序列合成 RNA 或蛋白质的过程既不是无规律的，也不是完全事先决定的。一个生物体基因组所包含的信息必须是以一种有序的形式记录并且能够对内外的环境变化作出有序的响应。

遗传信息如何组织以及如何能够在合适的时间段进行定位和调整是基因调控的一个谜。基因转录和翻译的复杂机理暗示这些过程的增强和抑制可能是更加复杂的。事实上，我们已经看到了很多蛋白因子的协作影响转录和翻译的速度和特异性。在这一章里，我们通过考察原核和真核生物遗传信息对一个细胞的形态和新陈代谢的多种调控策略来进一步研究基因的表达。

1. 基因组形态

基因组学(genomics)是随着 DNA 快速测序技术的到来而建立的一门庞大的学科，这种测序就好像是我们绘制生物体的染色体一样。曾经用于确定基因的寡聚核酸探针杂交研究方法现在可以通过与基因文库中的数据进行核苷酸序列的比较来实现(见节 5-3D)。事实上，计算机化的基因文库是存储一个基因组序列所包含的巨大信息的惟一可能的应用形式。一个相对简单的幽门螺旋杆菌被简化后的基因组图谱都具有令人眼花缭乱的排列(图 27-1)。然而，对生物体整个 888 基因组的测序和绘制的能力使我们能够了解一个生物体具有多少基因，这些基因是如何组织的，又是如何在生物体中作用的。

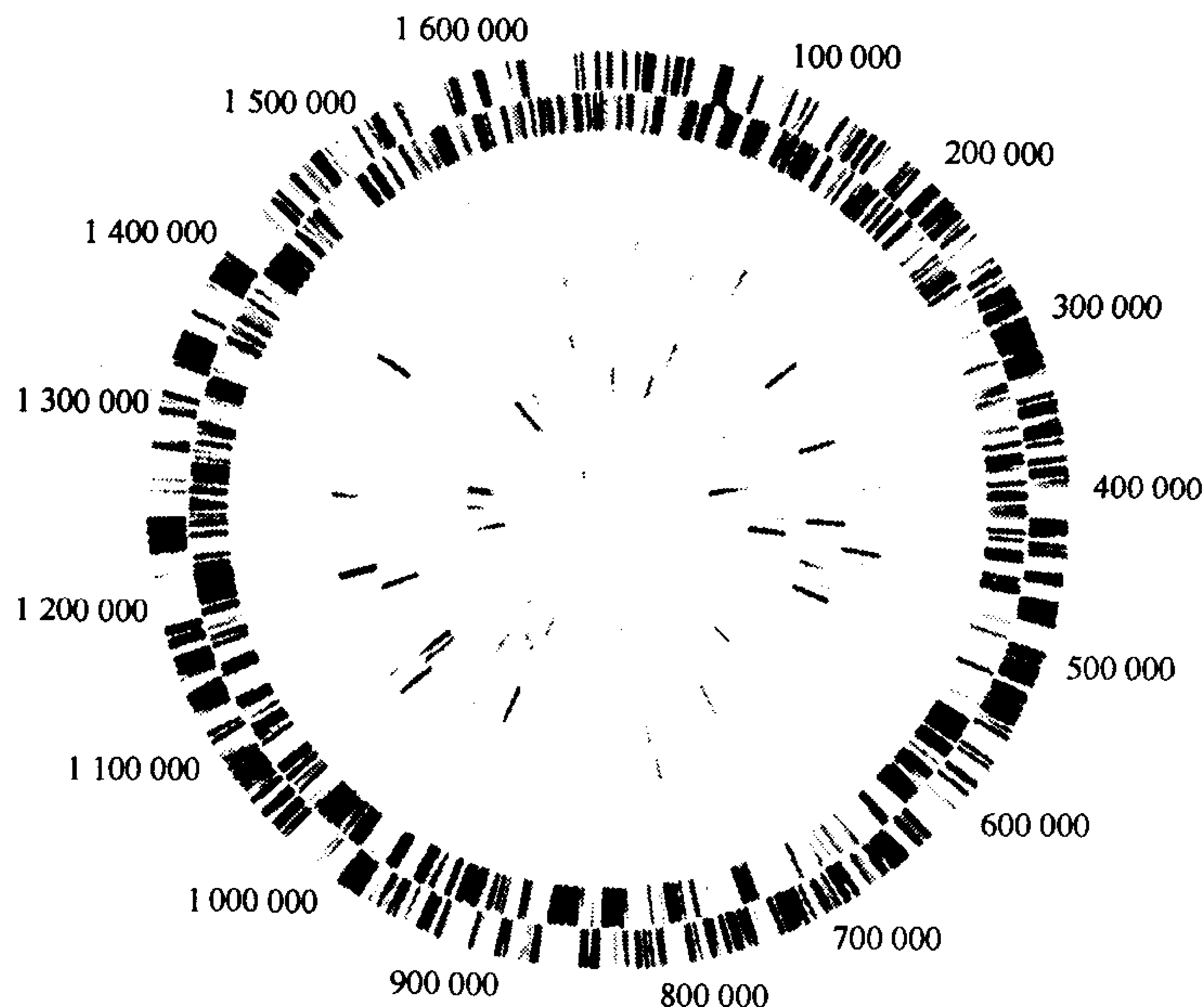


图 27-1 幽门螺杆菌含 1670Kb 的环状染色体图谱

图的外圈代表(+)链，第二圈代表(-)链。图最外圈的不同颜色代表了 1590 个预测的蛋白质编码序列(占基因组的 91%)。第三和第四圈代表了一些插入序列单元和其他重复序列(占基因组的 2.3%)。第五和第六圈代表 tRNA、rRNA 和其他小分子 RNA(占基因组的 0.7%)。基因间序列占基因组的 0.6%。(引自 J. Craig Venter, The Institute for Genomic Research, Rockville, Maryland)

A. 基因数目

生物体具有的遗传物质的数量(C 值)与其形态和新陈代谢的复杂程度(表 3-4)之间的大致相关性有很多不成正相关的例外情况,这就是我们所谓的**C 值矛盾**(C-value paradox)。例如,肺鱼比哺乳动物的基因组要大 10～15 倍左右(图 27-2)。有一些海藻的基因组甚至还要大 10 倍。我们知道这些"额外"的 DNA 是不表达的,但是它们具有什么功能却是一个很大的疑问。然而从几种原核生物和一种真核生物的完整的基因组所具有的大量初步数据来看,**显性基因的数目和生物体基因组所包含的所有 DNA 数目一样,基本上是和生物体的复杂性正相关的**(表 27-1)。人类的基因大概是 75 000 个(估计范围是 60 000～100 000 个),而大肠杆菌有 4288 个基因。

表 27-1　各种生物体蛋白质编码基因的大致数目

生物体	大致基因数目
原核生物	
生殖道枝原体(*Mycoplasma genitaliun*)	470
幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*)	1590
詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)	1738
流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)	1743
大肠杆菌(*Escherichia coli*)	4288
真核生物	
塞里维辛酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)	5885
共生线虫(*Caenorhabditis elegans*)	13 000
玉蜀黍(玉米)[*Zea mays*(corn)]	30 000
现代人(*Homo sapiens*)	7500

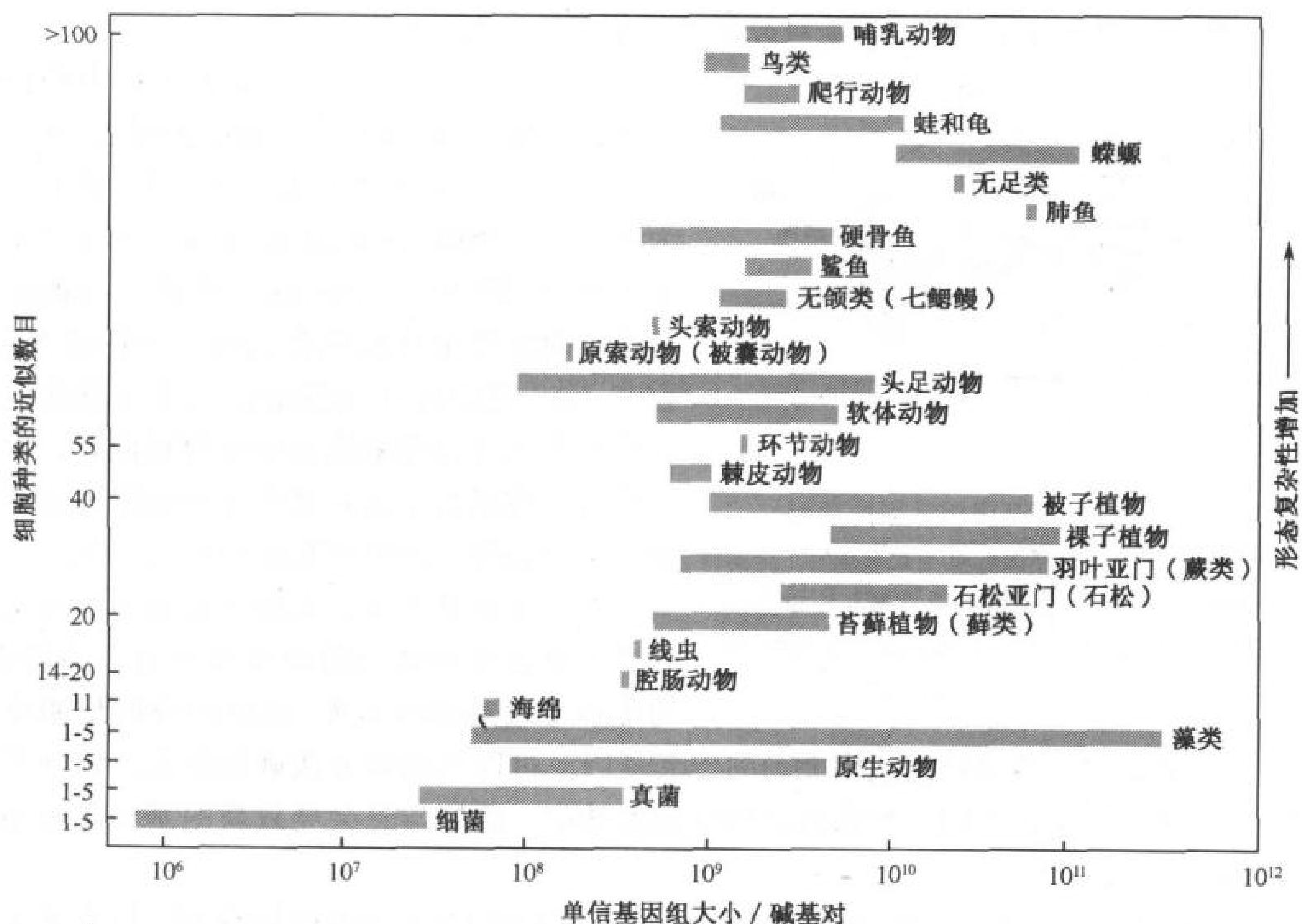


图 27-2　单倍基因组大小(碱基对)

左纵轴为:细胞种类的近似数目;右纵轴为:形态复杂性增加。

基因的最小数目是多少?

流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)基因组(1743 个基因)和生殖道枝原体(*Mycoplasma genitalium*)基因组(470 个基因)都是由 J. Craig Venter 完成测序的,比较这两者的基因组序列,发现它们有 233 个相同的基因。这些生物都是寄生于人类的,缺少用于基本的生化途径的基因(它们依靠宿主提供一定的中间物质)。通过"加和"这些基因和"去除掉"寄生所需要的基因,我们可以估计大约最少 250 个基因可以维持细胞的生命。因为这些基因很多是相关的,所以可以推测原始的基因设置甚至更少。当然,由于受到进化史的限制,进化并不一定要求达到最高效。

889

确定基因功能

酵母的基因组,由分布于 16 条染色体的 12 100 kb 的 DNA 组成,含有 5885 个编码蛋白的基因,是目前为止完成的最长测序。酵母的基因组是相对紧凑的,整个序列的 70% 有**可读框**(open reading frame ,ORF),即没有被终止密码子中断、与生物体内其他基因有同样密码优先权的潜在蛋白质编码序列。用计算机分析 ORF,从序列上看,约有一半的编码蛋白质类似于已知功能的蛋白质。这种同源性的分析表明,例如对于酵母,有 11% 的蛋白质用于基础代谢,3% 的蛋白质用于能量的产生,7% 的蛋白质用于转录。因为并不是所有的 ORF 可以被指定一个明确功能,所以这些数字肯定是比较保守的。事实上,大约有 2000 个基因没有发现已知的功能。阐明这些被称作**孤独基因**(orphan gene)的功能是对分子生物学家的巨大挑战。

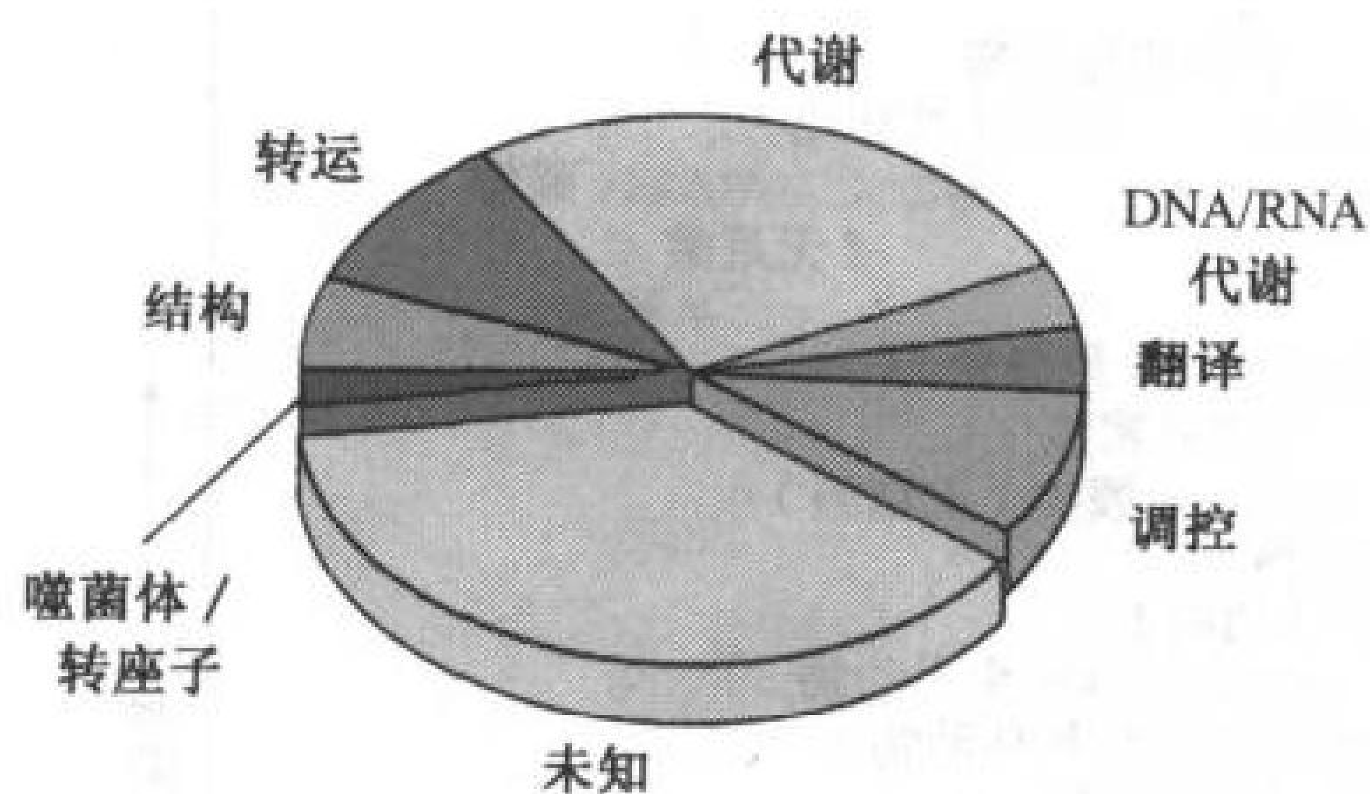


图 27-3 大肠杆菌基因组基因的功能
大约 4288 个编码蛋白质的基因近 40% 已被确定。全基因组的测序表明,还有 40% 的基因不能根据其他相似基因的功能来确定它们的功能。[引自 Blattner, ER 等提供的数据. Science 277, 1458(1977)]

由 Frederick Blattner 完成测序的大肠杆菌基因组的长度为 4639kb,也有类似的情况,尽管大肠杆菌在过去的 50 年中被大量地研究,是了解得最为清楚的生物体,但是,还有 30%～40% 的基因功能未知(图 27-3)。当然,这其中的一些孤独基因已经被确证是生化反应和调整过程的常见物质。在节 6-2C 我们提到过轻微改变蛋白质结构的核苷酸替代法可以用来掩盖功能的相似处。发展能鉴定蛋白质结构序列的更先进的数据搜索工具将毫无疑问会提高新测序基因的确证工作。

*有一些孤独基因会表达一些在标准的实验条件下已确定的特殊功能的新蛋白质。*在将来,有可能通过考察基因文库,剔除掉普通代谢功能的基因,只留下决定生物体独特的代谢能力的一套基因。可以用这种方法确定那些决定细菌毒性的基因,它们通常不出现在同一种类的非致病性菌株中。这些信息会导致新的基于生物独特新陈代谢的治疗方法。

*生物体基因的编码还可以确证猜想的进化关系。*含有 1738 个编码蛋白基因的詹氏甲烷球菌(*Methanococcus jannaschii*)完整的基因组表明,它含有固氮酶和用 H_2 还原 CO_2 产生甲烷所需要的酶。它的很多翻译机器类似于细菌和真核细胞,但是,奇妙的是,它的转录和复制蛋白却更接近于类似的真核生物。对于细胞功能某些方面的研究指出,*M. jannaschii* 合成代谢基因反映了细菌和古细菌所共有的远古代谢领域。相反地,它的细胞信息处理系统证明了真核生物和古

细菌的同源性。

B. 基因簇

在图 27-1 中，我们看到被颜色标注的基因，这些颜色是基于基因的假定功能，可见基因组中的基因是无规律分布的。在所有的已测序基因组中都有这种现象，也就是说，基因组中连续的部分与别的部分相比，含有相对多的基因或者有特殊功能的基因。但是，最近的研究表明一些蛋白编码基因和染色体的其他部分在排列上有一定程度的规律性。例如，原核生物通常含有操纵子，这些具有相关功能(例如编码在特定代谢过程中涉及的蛋白质)的操纵子通常很接近，有时这些操纵子的排列顺序和它们的编码蛋白在代谢过程中的作用顺序是一致的。

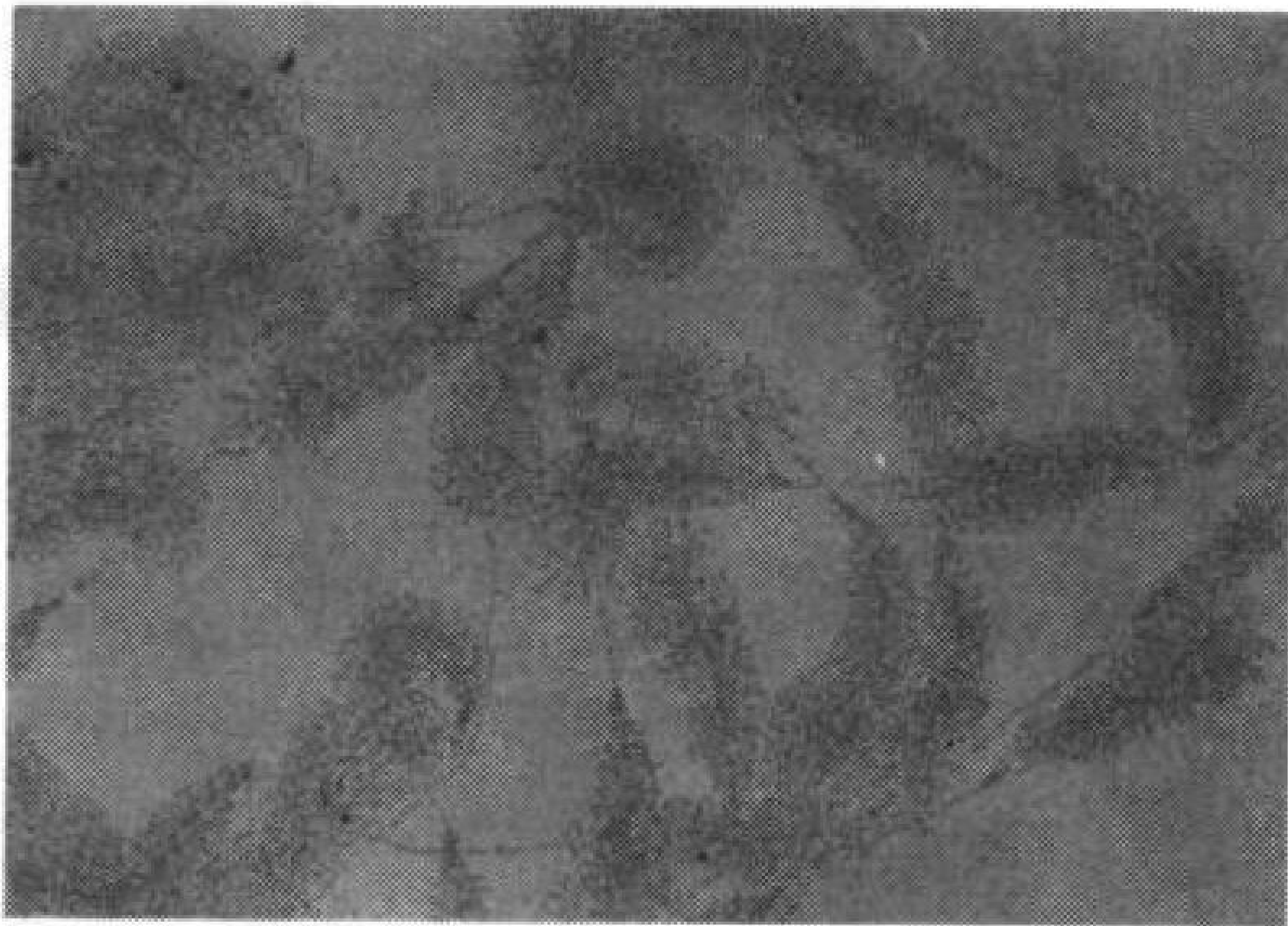


图 27-4 蝾螈(*Notophthalmus viridescens*)正在进行转录中的 18S、5.8S 和 28S rRNA 基因一前一后序列的电镜照片

轴向的光亮纤维是 DNA。纤维状的"圣诞树"矩阵是有新合成的 RNA 链和蛋白质的复合物构成，描绘了每一个转录单位。注意最长的核蛋白分支也只有对应的 DNA 长度的 10%。显然，RNA 链是靠二级结构的相互作用或者与蛋白质的作用而紧凑地结合在一起。矩阵外的 DNA 游离片段是非转录的间隔区。(引自 Oscar L. Miller, Jr. 和 Barbara R. Beatty, University of Virginia)

在原核生物和真核生物中都有**基因簇**(gene cluster)的存在。尽管大部分基因在生物体的单倍基因组中只出现一次，但由于 rRNA、tRNA 的需要是相对大量的，像这些对应 rRNA、tRNA 的基因在单倍基因组中却是多拷贝的。如同我们在节 25-3B 看到的，大的 rRNA 模板会产生成熟的 rRNA 分子。而且，真核生物的 18S、5.8S 和 28S rRNA 基因的转录模块都是被非转录区隔开的一前一后的重复序列(图 27-4)。rRNA 基因，可能分布于好几个染色体上，根据物种的不同，在单倍体上的数量从少于 50 到超过 10 000 不等。例如，人类有 50～200个 rRNA 基因区域分布在 5 条染色体上。tRNA 基因也有类似的重复和簇分布情况。

编码蛋白质的基因通常都没有重复的情况，原因大概是少量的 mRNA 反复的翻译可以产生足够的大部分蛋白质。有一个例外是组蛋白，在 DNA 合成的短时间内需要大量的这种蛋白质。组蛋白基因不仅仅是重复的(在果蝇基因组中大概有超过 100 次重复)，而且总是以 5 个不同的组蛋白基因被非转录区隔开的形式排列(图 27-5)。非转录的空白区在不同的物种之间差别很大，同时在一定程度上也因基因组中五重重复的不同而不同。鸟类和哺乳动物，各含有 10～20 个这种 5 个重复的组蛋白基因的拷贝，这些基因的排列是成簇的但是没有特定的顺序。

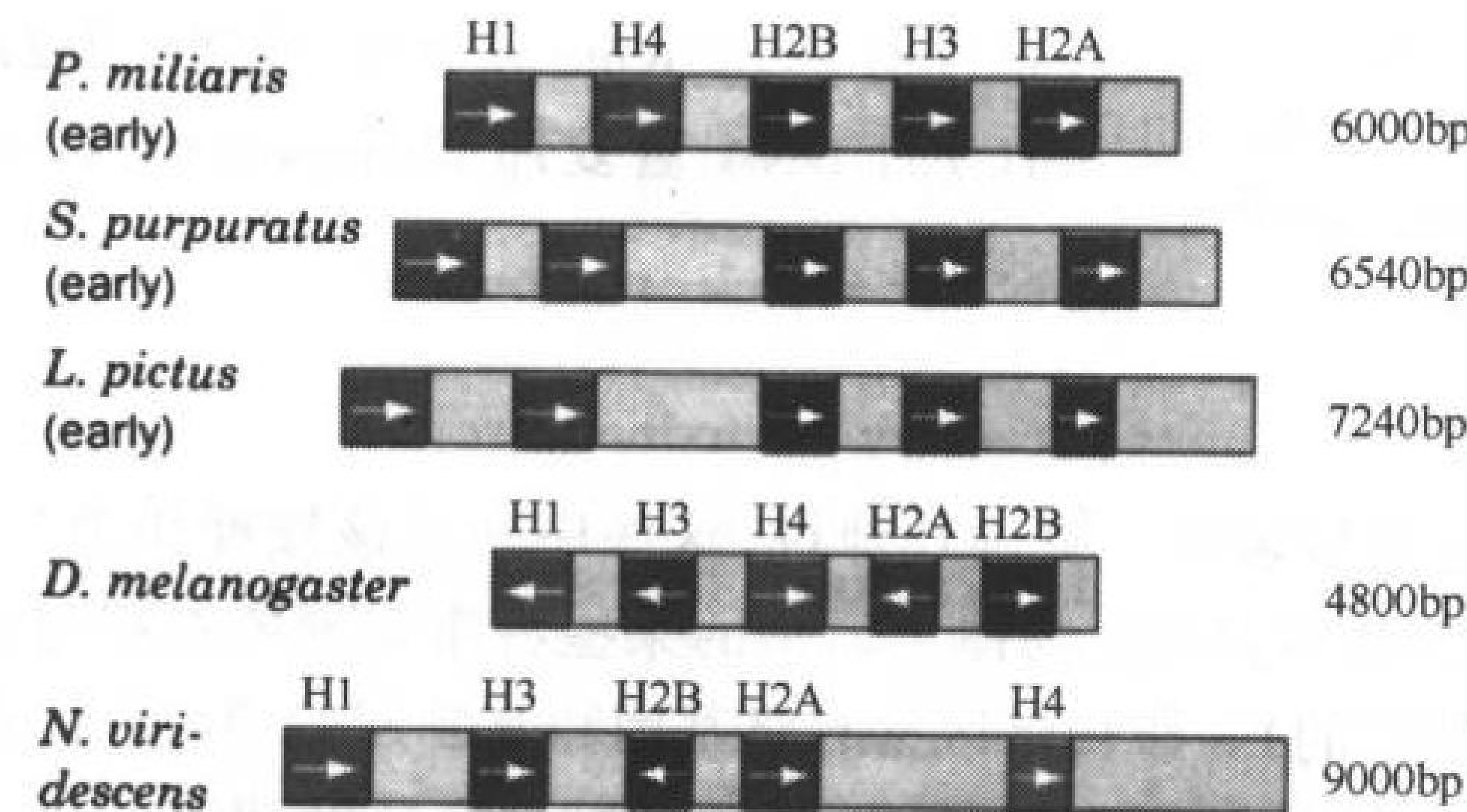


图 27-5 不同生物体中组蛋白基因簇重复单位的长度和结构

编码区着色、间隔区灰色，箭头指出转录的方向(顶上三种生物体是关系较远的海胆)

891 其他基因簇含有相似的但不确定的基因。例如人类的珠蛋白基因按簇的形式分布在 2 条染色体上(图 27-6)。在发育的不同阶段,有不同的基因进行转录。成人的血红蛋白是一种 $\alpha_2\beta_2$ 四聚体,而人类胎儿产生的最早的血红蛋白是 $\zeta_2\varepsilon_2$ 四聚体,其中 ζ、ε 分别是 α、β 的相似亚基。大约在胎儿形成后 8 周,出现含有 α 和 γ 亚基的胎儿血红蛋白。在出生前的几周开始,γ 亚基逐渐被 β 亚基取代(图 27-7)。成人的血液中通常含有约 97% 的 $\alpha_2\beta_2$ 血红蛋白、2% 的 $\alpha_2\delta_2$(其中 δ 亚基是 β 亚基的变体)和 1% 的 $\alpha_2\gamma_2$。

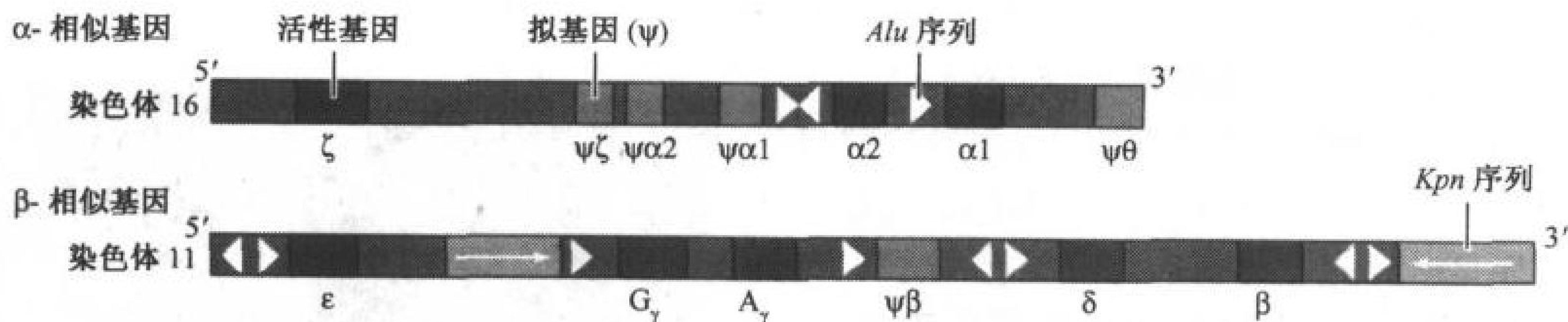


图 27-6 人类珠蛋白基因的结构

红色框代表活性基因,绿色框代表拟基因,黄色框代表重复的 Kpm 序列。箭头指出它们的相应方向,三角代表重复的 Alu 序列和它们相应的方向。[引自 Karlson S. 和 Nienhuis, A. W., Annu. Rev. Biochem. 54, 1074(1985)]

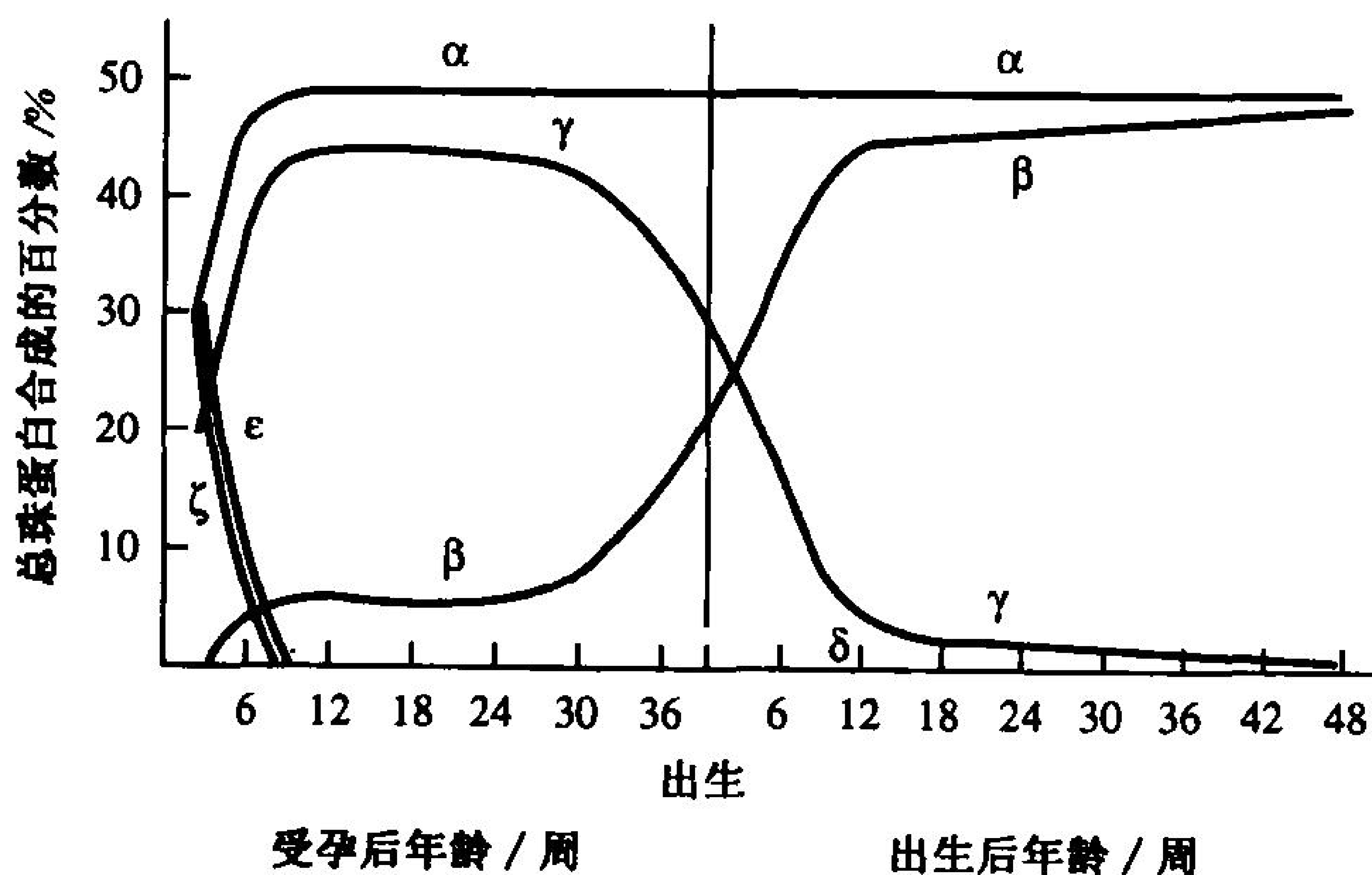


图 27-7 在胎儿发育中人珠蛋白合成的过程

注意任何一个红细胞只含有一个 α 相似亚基和 β 相似亚基。[引自 Weatherall D. J. 和 Clegg, J. B., The Thalassaemia Syndromes(3rd ed.), p. 64, Black-well Scientific Publications(1981)]

28kb 长度的 **α-珠蛋白基因簇**(α-globin gene cluster)(图 27-6, 上),含有 3 个功能基因:胚胎的 ζ 基因和两种编码同样多肽的 α 基因,α1 和 α2。α 基因簇还含有 4 个拟基因(非转录的原始重复基因残遗):Ψζ、Ψα2、Ψα1、Ψθ。60kb 长度的 **β-球蛋白基因簇**(图 27-6, 下),含有 5 个功能基因:胚胎的 ε 基因、胚胎的 $^G\gamma$ 和 $^A\gamma$(这两种基因编码的多肽仅仅是在第 136 位上的 Gly 和 Ala 的区别)、成人的 δ 和 β 基因。α 和 β 基因簇都含有称作 ***Kpn*** 和 ***Alu*** **序列**(节 27-1C)的 **DNA 重复序列**(repetitive DNA sequence)。

C. 非转录 DNA

大肠杆菌的基因组内大约含有 11% 的非转录区。更确切地说,这些序列应该被称作为“不能进行转录”,也就是说它们没有 ORF(很多基因只在生物体生命中的某些特定时期或在特定的环境条件下进行转录,而在其他时期是非转录的)。非转录区含有将基因和复制起始和终止的位置分开的调控序列。另外,细菌的基因组特有地含有插入序列(节 24-6B)和完整噬菌体基因的残余(节 27-2D)。

真核生物基因组含有重复序列

较小的原核生物基因组可能尽力地限制无用 DNA 的聚集。真核生物的基因组，由于通常都比原核生物的基因组要大得多，显然就不用受限于这种选择压力。例如，酵母基因组大约有 30%是非转录序列。在高等真核生物中，这一比例更高(人类是 98%)。这些 DNA 的大部分是重复序列。在真核生物染色体的**着丝粒**(centromere)上有这种重复 DNA 的高度集中，在有丝分裂期间，这些区域附着于微管蛋白纺锤上。这些序列可以帮助排列染色体和促进重排。端粒也是由重复 DNA 序列组成的(节 24-3C)。有不少的人类疾病是由于密码子序列的过度重复所引起的(框 27-1)。

892

框 27-1　健康和疾病的生物化学

三核苷酸重复疾病

人类的几种神经性疾病是与一定基因上三核苷酸的重复有关的。这些三核苷酸重复具有罕见的遗传不稳定性：当重复序列超过 35～50 拷贝(100～150bp)，就有一代一代连续扩展的趋势，这种扩展的机理尚不明了。由于这种重复序列很有特点，重复的总长度与疾病的发作时间相关联，三核苷酸重复疾病的遗传个体会越来越严重，发病年龄也越来越小。这种疾病因此被认为具有遗传预期性。

有些三核苷酸重复疾病是由于某一基因非编码区的一组三核苷酸大量扩充(通常能达到上百个拷贝)，这些编码区有转录起始点的上游部分，5′或 3′端的非翻译区(UTR)，或内含子(如表所示)。这种扩充通常会影响到基因的表达，例如，蛋白激酶的异常表达会造成肌强直营养失调。这种疾病的症状与 CTG 重复的数目相关(有些可以达到 2000 拷贝以上)，严重时候肌肉逐步的衰弱和萎缩。

Fragile X 综合征，是 Down's 综合征后引起痴呆的常见原因，在其中，成百上千拷贝的三核苷酸重复促使了 X 染色体长臂尖端与其他部分的轻微连接发生断裂。如同很多三核苷酸重复疾病一样，fragile X 综合征具有非孟德尔遗传的想象：20%～50%的男性 fragile X 突变者是没有症状的。他们的女儿同样是无症状的，但是他们女儿的孩子却有可能具有综合征。显然，fragile X 缺陷不知何故要通过女性来激活。

另有一些三核苷酸重复疾病是由于 CAG 三核苷酸的适度表达而造成的，在基因的蛋白编码框中，CAG 是谷氨酸的密码。大概是这种表达产生了杀死细胞的无功能蛋白，特别是在神经系统中。在 Huntington's 疾病中出现这种神经细胞的缺失，表现为破坏性的情形，如越来越严重的混乱性活动(舞蹈症)，认知能力下降，情绪紊乱等。这种遗传显性且总是致命的疾病通常在 40 岁左右发作并持续 10 到 20 年。在相关基因(这种基因编码一个 3145 残基的多肽，称作 Huntingtin)中的重复 CAG 序列正常情况下是 11～34 个拷贝，但是在病人的相关基因中却增至 37～876 个拷贝。

一些与三核苷酸重复有关的疾病

疾病	重复序列	重复的位置
Fragile X 综合征	CGG 或 CCG	5′末端
肌强直营养失调	CTG	3′末端的上游区域
Fridrich's 失调	GAA	内含子
刺芽球根肌肉萎缩	CAG	外显子
Huntington's 疾病	CAG	外显子

高度重复序列(highly repetitive sequence，在单倍体中有大于 10^6 的拷贝)是基本相同的约 10 bp 长的序列上千次连续重复形成的簇。这些 DNA 区域也称作**卫星 DNA**(satellite DNA)，因为其特有的成分使得在超速离心法分离 DNA 片段时，它们形成与主要 DNA 区分开的区带(图 27-8)。三种果蝇的卫星序列含有很接近的 7 个核苷酸的重复序列：

(果蝇的三个卫星序列)

5′—A C A A A C T—3′
3′—T G T T T G A—5′
卫星 I

5′—A T A A A C T—3′
5′—T A T T T G A—5′
卫星 II

5′—A C A A A T T—′3
3′—T G T T T A A—5′
卫星 III

893

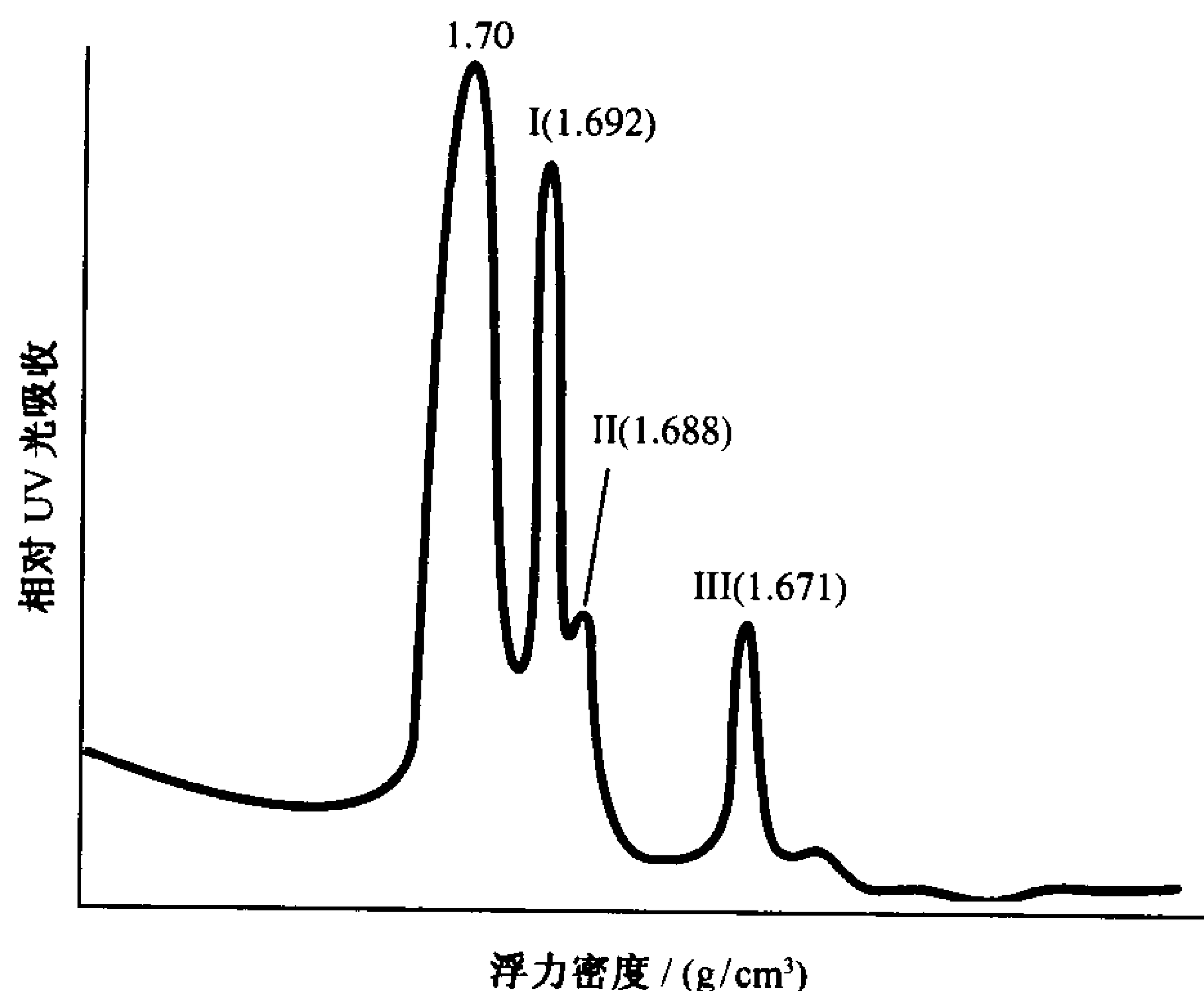


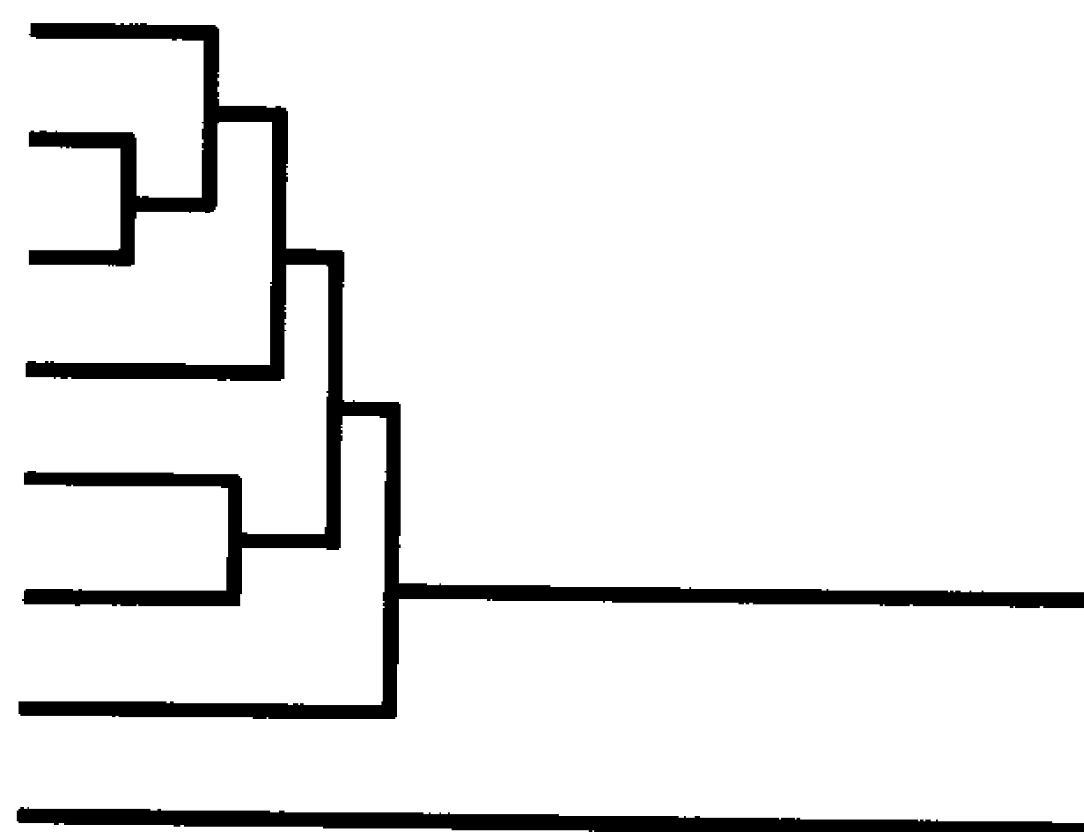
图 27-8 果蝇 DNA 在中性 CsCl 中离心平衡后形成的浮力密度图谱 其中有卫星 DNA 的三个主要带(密度分别为 1.692、1.688、1.67lg/cm³)。另有一个主要 DNA 带(密度为 1.70g/cm³)。[引自 Gall J. G., Cohen E. H. 和 Atherton D. D., Cold Spring Harbar Symp. Quant Biol. 38,417(1973)]

中度重复序列(moderately repetitive sequence, 每个单倍体基因组含有小于 10^6 的拷贝)是一种散布于独特的 DNA 大区域内的由成百上千的碱基对组成的片段。我们了解得最清楚的这种序列是 *Alu* 家族(这个名称是因为序列中大部分的约 300bp 长度的片段含有限制性内切核酸酶 ***Alu*** I 的切割位点,表 3-3)。人类的基因组含有 300 000 到 500 000 个广泛分布的 *Alu* 序列,这些序列平均有 80%~90%的序列与它们同源共同序列相同。*Alu* 家族是很多生物体最显著的中度重复序列,但是脊椎动物的基因组通常含有好几种不同的中度重复序列(例如,图 27-6 中的 *Kpn* 序列)。

框 27-2 生物化学相关内容

从 DNA 序列推断系谱

DNA序列的突变可以产生或消除限制位点,从而使得该 DNA 在被原核限制性内切核酸酶作用时生成大小不等的片段(3-4A 和文框 3-1)。几类人种的系谱就是这样推断的,也就是说通过 β-珠蛋白基因簇的 5 个片段的限制内切碎片的长度多样性来推断的。这一研究导致了"家族树"的构建,在其中,水平轴的长度表明了人种之间遗传学上的距离,从而表明他们分化时间的长短。这一系谱表明欧洲人中相互之间非常的接近,而它们与非洲人则相对要远的多。对于化石的研究表明,解剖学上的现代人是大约 100 000 年以前从非洲发源的,并很快的散布到大陆上。这一系谱揭示了所有的欧洲人种是一个非常非常小的"奠基人群"(大约只有几百个个体)的后代,这一"奠基人群"大约在 50 000 年前离开了非洲。



[引自 wlainscoat, J. S., Hill, A. V. S., Boyce, A. L. Flint, J., Hernandez, M., Thein, S. J., Old, J. M., Lynch, J. R., Falusi, A. G., Weatherall, D. J., and Clegg, J. B., *Nature* 319, 493(1986)]

毫无疑问，中度重复序列是没有功能的，它们在专业上被称作**自私 DNA**(selfish DNA)或**无用 DNA**(junk DNA)。这种 DNA 显然是一种分子寄生虫，经过很多代后，它们通过调换将自己分布于基因组中(节 24-6B)。通过自然选择理论可以预知，这种无害的自私 DNA 的复制所增大的代谢压力将最终导致这种序列的消除。但是对于缓慢生长的真核生物而言，在约十亿 bp 的基因组中复制多余的 100bp 自私 DNA 所带来的负面影响是如此之微小，以至于这种垃圾序列的消除速度被它的繁殖速度所平衡而显示不出来。

20 亿 bp 长度的玉米基因组的一半是由可移动的序列组成的，很多这些可移动序列中插有其他的可移动序列。在约 $10^8 \sim 10^9$bp 的植物基因组中，这种"占便宜"的序列占据相当可观的部分。转座子的非移动部分在哺乳动物的基因组中也占有很大部分。*这些不表达序列相对于表达序列，选择压力更小而累积突变更快。*产生的变化可以被用来描述进化关系(框 27-2)。

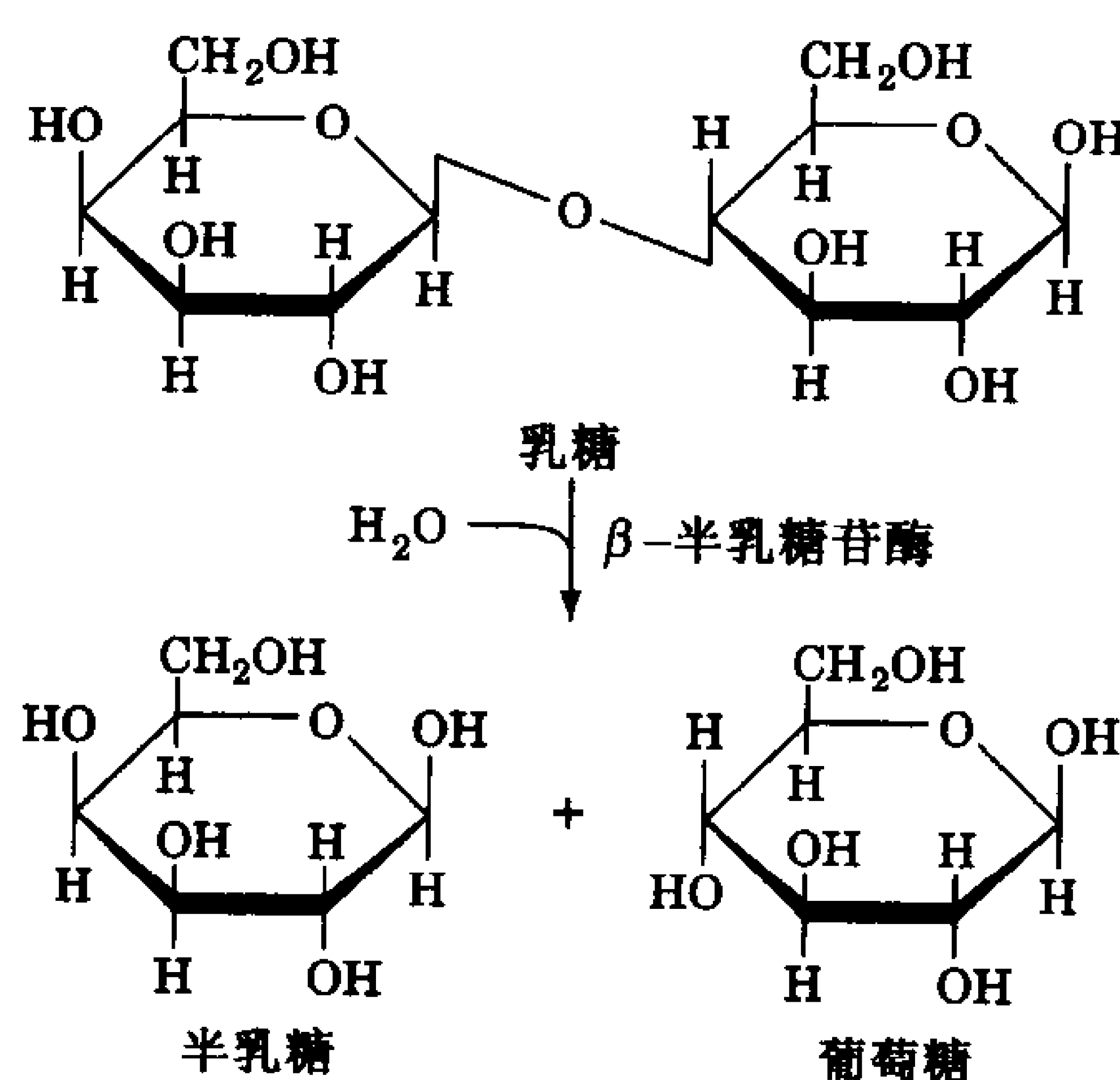
2. 原核基因表达调控

894

一个生物体的完整基因组可以显示该生物的代谢能力，但是*单独的基因序列不足以指出编码的分子在何时何地产生。*在特定的发育阶段，有不同的途径来确定一定的细胞中基因的转录活化。这一信息将最终导致我们可以完整地描绘细菌的致病因素所需要的因子或者人类疾病的诱病因素所需要的因子。

从基因序列到功能基因的产生需要很多潜在的调控，但*在原核生物中，基因的表达全在转录水平控制。*这可能是因为原核生物的 mRNA 只有几分钟的寿命，所以翻译调控是不必要的。在这一节中，我们阐述几个已经了解得很透彻的原核生物转录调控的例子。在下一节中，我们将阐述真核生物是如何调控基因表达的。

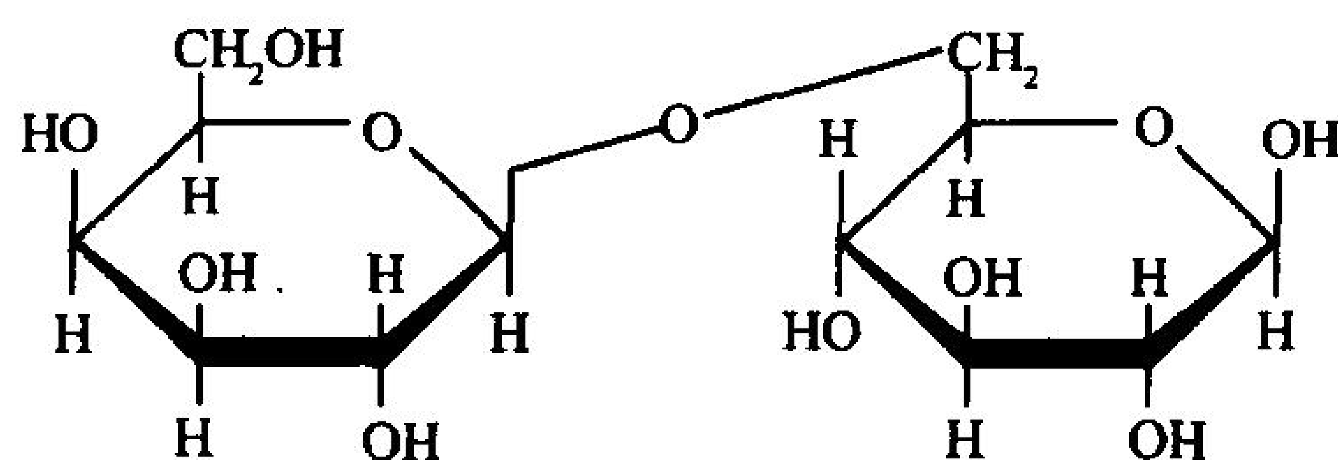
A. *lac* 阻遏物

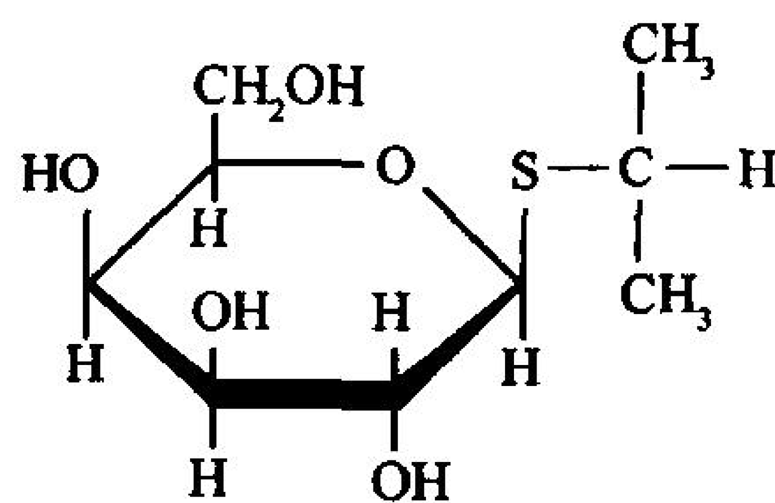


细菌可以通过产生使用存在的底物作为代谢介质的酶来适应环境。例如，在没有乳糖的环境中生长的大肠杆菌细胞开始不能利用这种二糖进行代谢。利用乳糖进行代谢需要两种蛋白质：催化乳糖水解生成组成单糖的 **β-半乳糖苷酶**(β-galactosidase)，和将乳糖转入细胞的**半乳糖苷通透酶**(galactoside permease)[又称作**乳糖通透酶**(lactose permease)]。在没有乳糖条件下生长的细胞仅仅含有一点点这些蛋白质。但在介质中加入乳糖的几分钟后，这些细胞提高这些蛋白的合成速度到大约 1000 倍以上，并保持这种速度直到乳糖耗尽。*这种只在代谢底物存在的环境中产生相关的一系列蛋白质的能力，使得细菌可以通过不需要生成大量的无用酶来适应环境。*

乳糖或者它的代谢产物必须是上述这些蛋白质合成的**诱导物**(inducer)。乳糖系统的生理性诱导物，乳糖异构体 **1,6-异乳糖**(1,6-allolactose)，由乳糖通过 β-半乳糖苷酶偶然的转糖苷作用产生。在体外乳糖代谢研究中大多使用**异丙基硫代半乳糖苷**(isopropylthiogalactoside, IPTG)，一种合成诱导物，是不能被 β-半乳糖苷酶水解的异乳糖结构类似物。天然和合成的诱导物都能刺激硫代**半乳糖苷转乙酰酶**(thiogalactoside transacetylase)的合成，这种酶的生理功能还未知。

895


1,6-异乳糖


IPTG

如图 25-4 所示，分别被表示为 Z、Y 和 A 的 β-半乳糖苷、半乳糖苷通透酶、硫代半乳糖苷转乙酰酶连续地排列在 *lac* 操纵子上。这三种结构基因是通过同一条 mRNA 翻译的。图中 I 是一个相邻的基因，编码 *lac* **阻遏物**(*lac* repressor)，这种蛋白质抑制这三种 *lac* 蛋白质的合成。

lac 阻遏物可以识别操纵子的序列

lac 阻遏物的作用位点在操纵子的**操纵基因**(operator)上，这个操纵基因接近于 β-半乳糖苷酶的开始部分。*在没有诱导物的情况下，lac 阻遏物特异性结合在操纵基因上阻止 mRNA 的转录(图 27-9a)。阻遏物结合诱导物后，就从操纵基因上解离下来，从而使之可以转录并进而翻译成 lac 酶(图 27-9b)。*

896

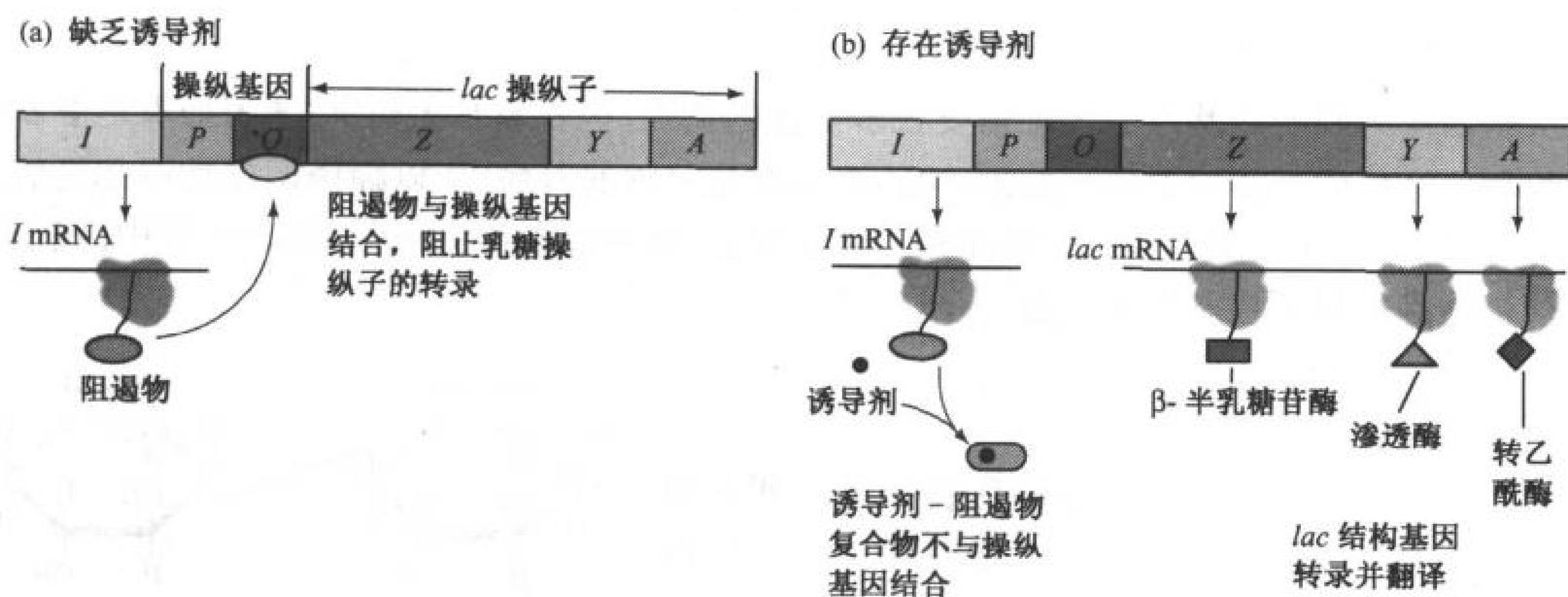


图 27-9 *功能的秘诀*：lac 操纵子的表达

(a)在缺乏诱导剂时，阻遏物(I 基因的产物)与操纵基因(O)结合，从而阻止了从启动子(P)开始的 *lac* 操纵子的转录。(b)与诱导剂相结合，阻遏物则从操纵基因上解脱，这样 *lac* 结构基因得以转录和翻译(Z、Y、A 分别代表 β-半乳糖苷酶、乳糖渗透酶和硫代半乳糖苷转乙酰酶的基因)。

事实上，*lac* 操纵基因是三个可以紧密结合 *lac* 阻遏物的操纵序列组成的，分别是：O_1、O_2、O_3。O_1 是最初的阻遏物结合位点，可以通过结合 *lac* 阻遏物来保护自己不被核酸酶水解。被保护的 26bp 的序列位于 35bp 的二重轴对称的邻近序列中(图 27-10)。O_1 与 *lacZ* 基因的转录起始位点相交叠。O_2 操纵序列位于操纵基因正中下游 401bp 处，涵盖了整个的 *lacZ* 基因，O_3 位于 O_1 上游 93bp 处，在 *lacI* 基因的末端。遗传工程实验表明在体内必须三个操纵序列都存在，抑制才能达到最高效。

lac 阻遏物结合 *lac* 操纵基因的表观速度是 $k \approx 10^{10}(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}\text{s}^{-1}$。这个启动速度要远远快于溶液中的 *lac* 阻遏物大小的分子的扩散控制速度：$k \approx 10^{7}(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}\text{s}^{-1}$。既然一个反应的速度不可能快于扩散控制的速度，那么 *lac* 阻遏物不可能是在任意的三维空间中寻找到操纵

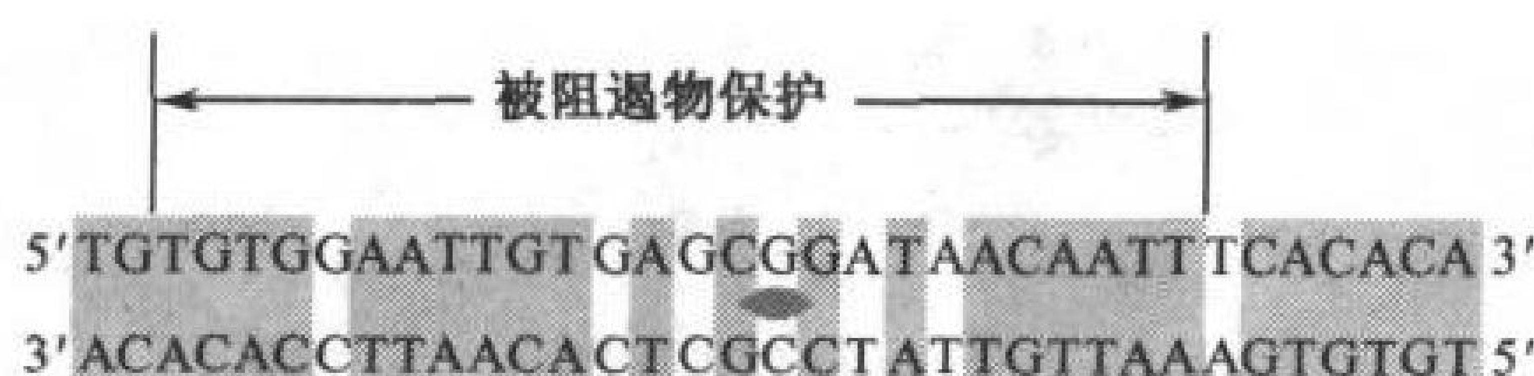


图 27-10　乳糖操纵基因 O 的碱基序列

它是被红色阴影框起的部分，是一个相互对称的区域，含有 28～35 个碱基。

基因的。确切的情况是 *lac* 阻遏物通过非特异性地结合在 DNA 上进行更高效的一维滑动寻找。

lac 阻遏物同时结合在两个 DNA 片段上

1966 年，Beno Müller-Hill 和 Walter Gilbert 分离出 *lac* 阻遏物的工作是相当困难的，因为它仅仅占大肠杆菌各种蛋白质的 0.002%。后来，分子克隆技术(节 3-5)使合成大量 *lac* 阻遏物成为可能。尽管如此，直到 1996 年，Ponzy Lu 和 Mitchell Lewis 才报道了这种蛋白完整的三维结构。这种阻遏物四聚体的每一个相同的 360 个残基的亚基都含有 4 个功能单位(图 27-11)。

1)一个 N 末端的帽子结构，它含有与其他原核生物 DNA 结合蛋白(节 23-4B)类似的螺旋-折叠-螺旋超二级结构，特异性地结合在操纵基因的 DNA 序列上。

2)一个结合 DNA 的连接部分，它含有一个用作铰链的 α 螺旋。没有 DNA 存在的情况下，四聚体的铰链解开，允许帽子结构可以自由地移动。

3)一个用于结合如 IPTG 诱导物的双区域中心。

4)一个 *lac* 阻遏物四级结构所需要的 C 末端 α 螺旋。在四聚体中，4 个 C 末端 α 螺旋结合在一起。令人惊讶的是，阻遏物四聚体并不像所有已知结构的亚基相同的四聚体蛋白质一样是 D_2 对称结构(有三个相互垂直的二重对称轴；节 6-3)，而是 V 型结构(只是二重轴对称)，所以更合适地说，是二聚体的二聚体(图 27-12)。



图 27-11　阻遏物单体的带状图示

红色表示 DNA 结合域的螺旋-折叠-螺旋结构，黄色表示 DNA 结合域的铰链区螺旋，淡蓝色和深蓝色表示诱导剂结合中心，紫色表示四聚化螺旋。(引自 Ponzy Lu 和 Mitchell Lewis, University of Pennsylvania)

lac 阻遏物与合成的 21bp 含有高亲和力结合序列的 DNA 形成的复合物的 X 射线结构表明，每一个阻遏物四聚体结合两个 DNA 片段(图 27-12)。阻遏物的 HTH 超二级结构很舒适地进入大沟，使 DNA 发生半径为 60Å 的弯曲。两个结合后的 DNA 片段大约有 25Å 的距离。



图 27-12 与 DNA 21 bp 片段结合的 *lac* 阻遏物四聚体的 X 射线结构图
阻遏物单体以带状形式表示，分别为绿、粉、黄和红色，DNA 以空间填充形式表示，为蓝色。（引自 Ponzy Lu 和 Mitchell Lewis, University Pennsylvania）

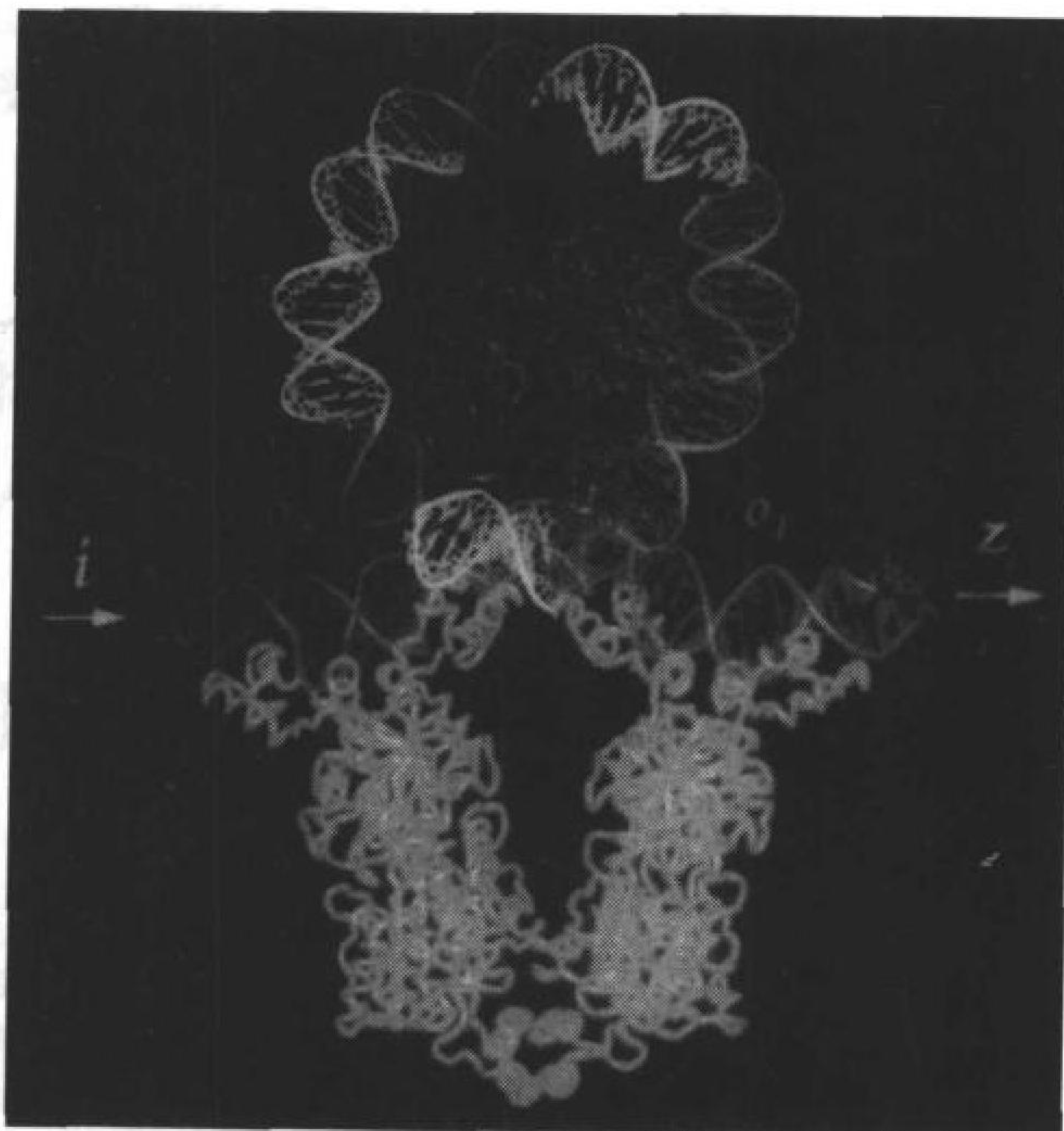


图 27-13 当四聚体 *lac* 阻遏物与 O_1 和 O_3 结合时形成的 93bp 环的模型
蛋白质以它们的 C_α 骨架表示，DNA 以其糖-磷酸主键骨架的螺旋带表示。此模型由 *lac* 阻遏物与操纵基因 DNA21bp 片段形成的复合物 X 射线结构图和 CAP（蓝色）与靶 DNA30bp 复合物的 X 射线结构图构建而成。余下的 DNA 环是启动子的 - 35～ - 10 区域的 B-DNA 的光滑曲线（亮绿色）。（引自 Ponzy Lu and Mitchell Lewis, University of Pennsylvania）

如图27-11所示,在亮绿和深绿色两个区域的界面上,IPTG结合在阻遏物的中心。这种结合引发阻遏物铰链螺旋与帽子结构相连的两个二聚体构象发生变化。导致分别处于两个二聚体上的DNA结合区域分开大概3.5Å,不能同时结合DNA,从而使阻遏物从DNA上解离。 897

*lac*阻遏物是一种变构蛋白:IPTG结合在一个亚基上改变了它配对亚基的DNA结合活性(但是并不影响阻遏物四聚体中的另一个二聚体)。既然这种构象的转变仅发生在二聚体内部,那么为什么完整的阻遏物活性需要四聚体结构呢?对这一疑问,建模研究给出了一个似乎有道理的答案。*lac*阻遏物四聚体同时结合两个操纵基因,将它们连接起来,形成一个93bp或401bp长度的DNA环,这两种不同的长度基于阻遏物是结合O_1、O_3或O_1、O_2。稳定的环状结构需要其他的DNA结合蛋白;一种可能是CAP(节27-2B),另一种是结合在O_1和O_3中间的DNA序列上的DNA结合蛋白。如图27-13所示,*lac*启动子是环状DNA的一部分。

多年以来,人们都认为*lac*阻遏物是简单的物理性阻隔RNA聚合酶和*lac*启动子的结合。然而,实验已经证明,阻遏物存在的情况下,RNA聚合酶可以结合上启动子,但却不能正确启动转录。诱导物存在下阻遏物的解离又允许不受阻碍的转录。如果RNA聚合酶已经结合在*lac*启动子上,转录会立即开始。不过,如图27-13所示,RNA聚合酶的接触表面位于DNA环的内部,这种情况阻碍了RNA聚合酶的结合。这一矛盾的解决需要进一步的研究。

B. 分解代谢物抑制:一个基因活化的例子

葡萄糖是大肠杆菌可选择的代谢能源;适量的葡萄糖可以阻止其他副产物发酵所涉及的基因的完整表达,甚至在这些副产物的浓度很高时也是如此。这些副产物包括乳糖、阿拉伯糖和半乳糖,这种现象就叫做**分解代谢物抑制**(catabolite repression),它防止了产能源酶系统的重复浪费。分解代谢物抑制在葡萄糖缺乏的情况下可以通过cAMP依赖机制来克服。当存在葡萄糖时,cAMP的水平是很低的,但是一旦葡萄糖缺乏,cAMP的水平将开始提高。 898

CAP-cAMP复合物刺激分解代谢物抑制操纵子转录

某些大肠杆菌突变体,缺少cAMP结合蛋白,此蛋白又叫**分解代谢物基因激活蛋白**(CAP)或**cAMP受体蛋白**(CRP),从而在葡萄糖缺乏的情况下,也不能缓解分解代谢物抑制。CAP是一个有两个相同210个残基的亚基的二聚体蛋白,它的亚基在结合cAMP后会发生很大的构象变化。在阻遏物缺乏的情况下,是CAP-cAMP复合物,而不是单独的CAP结合在*lac*操纵子的启动子区域启动转录。可见,CAP是一种**正调控因子**(positive regulator,开启转录),而相反的,*lac*阻遏物是一种**负调控因子**(regatiue regulator,关闭转录)。

CAP-cAMP复合物是如何作用的呢?*lac*操纵子有一个弱启动子(低效率)。一种可能的情况是,结合上CAP-cAMP复合物后会引起该启动子DNA构象的变化,从而增加RNA聚合酶转录*lac*操纵子的能力。事实上当CAP-cAMP结合上一个序列类似于CAP结合位点的30bp长度的DNA片段,X射线衍射显示的结构表明CAP二聚体通过它的二个HTH超二级结构结合在连续的DNA大沟内从而使DNA在结合蛋白二聚体的位点处扭曲90°(图27-14)。这种扭曲发生在结合物的双重轴之外,DNA的第5~6碱基之间的两个45°弯曲处并导致大沟的靠拢和小沟的极大扩展。对于转录的起始,这种扭曲的DNA比直链状态更为有效。第二种可能是CAP-cAMP直接与RNA聚合酶作用刺激转录的开始。事实上,CAP-cAMP在*lac*操纵子上的结合位点与*lac*启动子相重叠。

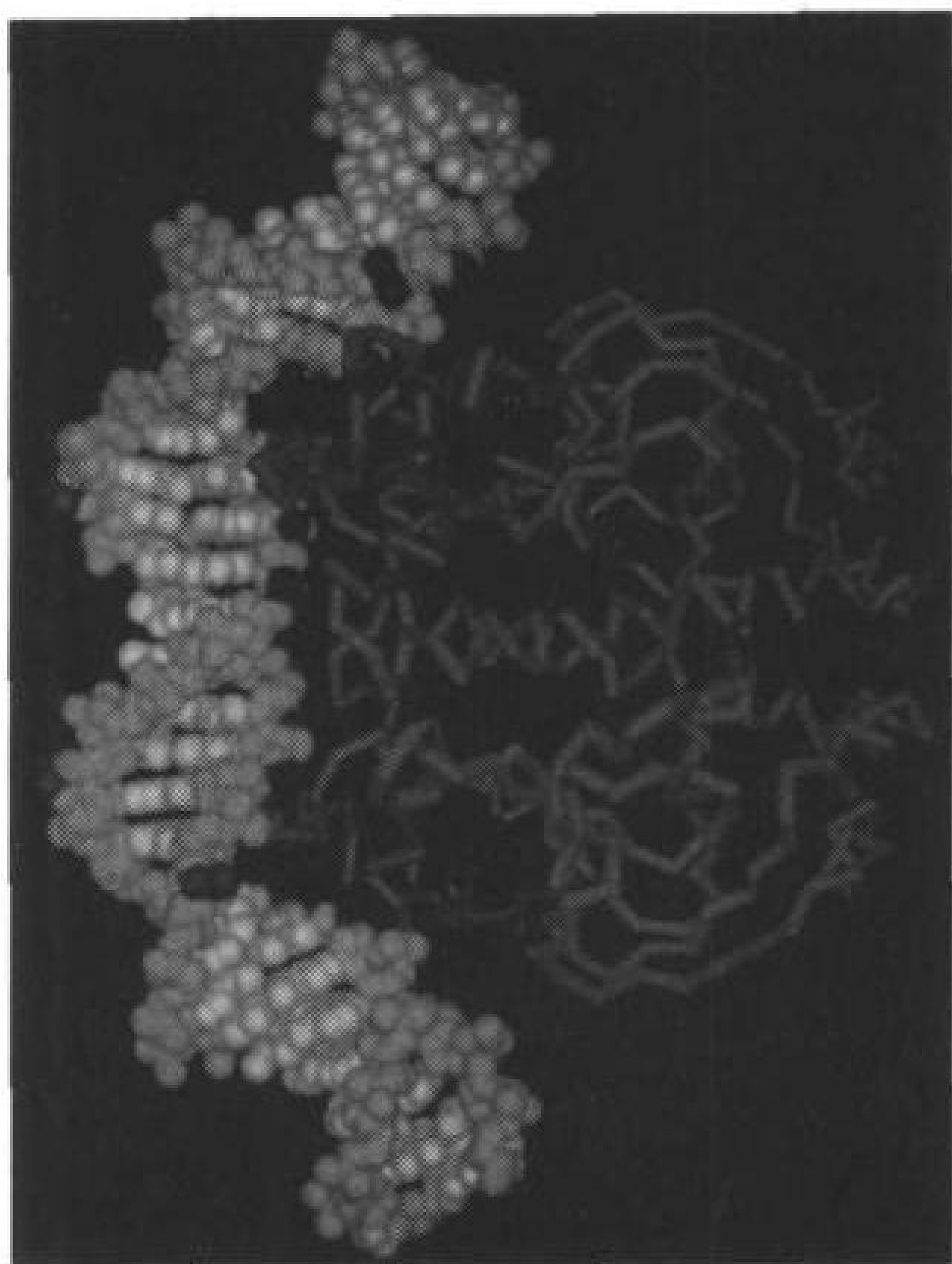


图 27-14 CAP-cAMP 二聚体与 DNA 结合的 X 射线结构图

具有二重水平对称轴的蛋白质用它的 C_α 骨架表示，蓝色的是 N 末端 cAMP 结合域，紫色的是 C 末端 DNA 结合域。空间填充的是 30bp 的自身互补 DNA，其糖-磷酸主键骨架为黄色，碱基为白色。红色的是与 CAP 乙酰化的 DNA 磷酸盐。蓝色的是复合物中对 Dnase I 非常敏感的部分(这些磷酸盐可以通过 CAP 诱导的扭曲部分，那里的小沟被极大扩展了)。红色部分的球棒式结构表示结合的 cAMP。(引自 Thomas Steitz, Yale University)

从 *lac* 阻遏物结合模型看(图 27-13)，其中居然包括作为增强子的 CAP。这种双重结合可能是为了在葡萄糖和乳糖都缺乏的情况下，贮藏细胞能量。一旦存在乳糖，*lac* 阻遏物解离下来，而 CAP-cAMP 保持在上面启动 *lac* 操纵子的转录。

C. 衰减

大肠杆菌 ***trp* 操纵子**(*trp* operon)编码 5 个多肽(分属于 3 个酶)调节从分支酸合成色氨酸的过程(节 20-5B)。这 5 个操纵子基因($A \sim E$，图 27-15)在 *trp* 阻遏物的控制下协同表达，*trp* 阻遏物和 L-色氨酸形成复合物，特异地结合在 *trp* 操纵基因上，降低 *trp* 操纵子的转录速度约 70 倍(节 23-4B)。在这个系统中，色氨酸是**辅阻遏物**(corepressor)，防止了色氨酸生物合成的过剩。

899

最初，*trp* 阻遏物-操纵基因系统被认为可以完全解决大肠杆菌色氨酸生物合成的调控。但是，研究发现操纵子下游的 *trp* 消除突变(*trp*O)可以提高 *trp* 操纵子的表达 6 倍，这表明存在另一种转录调控因子。这个调控因子位于 162 个核苷酸的**前导序列**(leader sequence, *trpL*)内，结构基因 E(*trpE*)的上游 30～60 个核苷酸处(图 27-15)。

当色氨酸缺乏的时候，将会合成含有 *trpL* 的完整 *trp* mRNA，它由 6720 个核苷酸组成，具有多顺反子。当其编码的酶开始合成色氨酸后，色氨酸结合上 *trp* 阻遏物，*trp* 操纵子的转录速度降低。在转录的 *trp* mRNA 中，仅含有相当于 *trpL* 5′端的 140 个核苷酸的片段越来越多。*从而，色氨酸的存在导致了 trp 操纵子转录的过早终止。*造成这种结果的控制元件通常称作为**衰减因子**(attenuator)。

色氨酸缺乏的时候，*trp* 衰减因子的转录终止子被掩盖

衰减因子的转录物包括 4 个完整的片段，能形成两套相互排斥的碱基对发卡结构中的一种(图 27-16)。片段 3、4 和后续的残余部分一起形成转录终止子(节 25-1D)：一个富含 G+C 的发卡结构后面跟着连续的 U(与图 25-10 比较)。除了在色氨酸很缺乏的情况下，转录一般是在这个终止子处终止。

色氨酸的缺乏是如何导致转录能越过这个终止子的呢？前导序列的一部分，含有衰减子的片段 1，被翻译成含有 2 个连续色氨酸残基的 14 个残基的多肽(图 27-16，左)。这种罕见的二肽的位置提供了衰减机理的重要线索(大肠杆菌蛋白质中约 1% 的残基是色氨酸)。如同 Charles Yanofsky 猜想的一样：避开抑制的 RNA 聚合酶启动 *trp* 操纵子的转录(图 27-17)。在核糖体起始位点的 *trpL* 序列被转录后不久，核糖体结合上去，前导肽开始翻译。当色氨酸丰富的时候(也就是说，有大量的色氨酸 $tRNA^{Trp}$的供应)，核糖体能够紧跟在正在转录的 RNA 合酶后面。

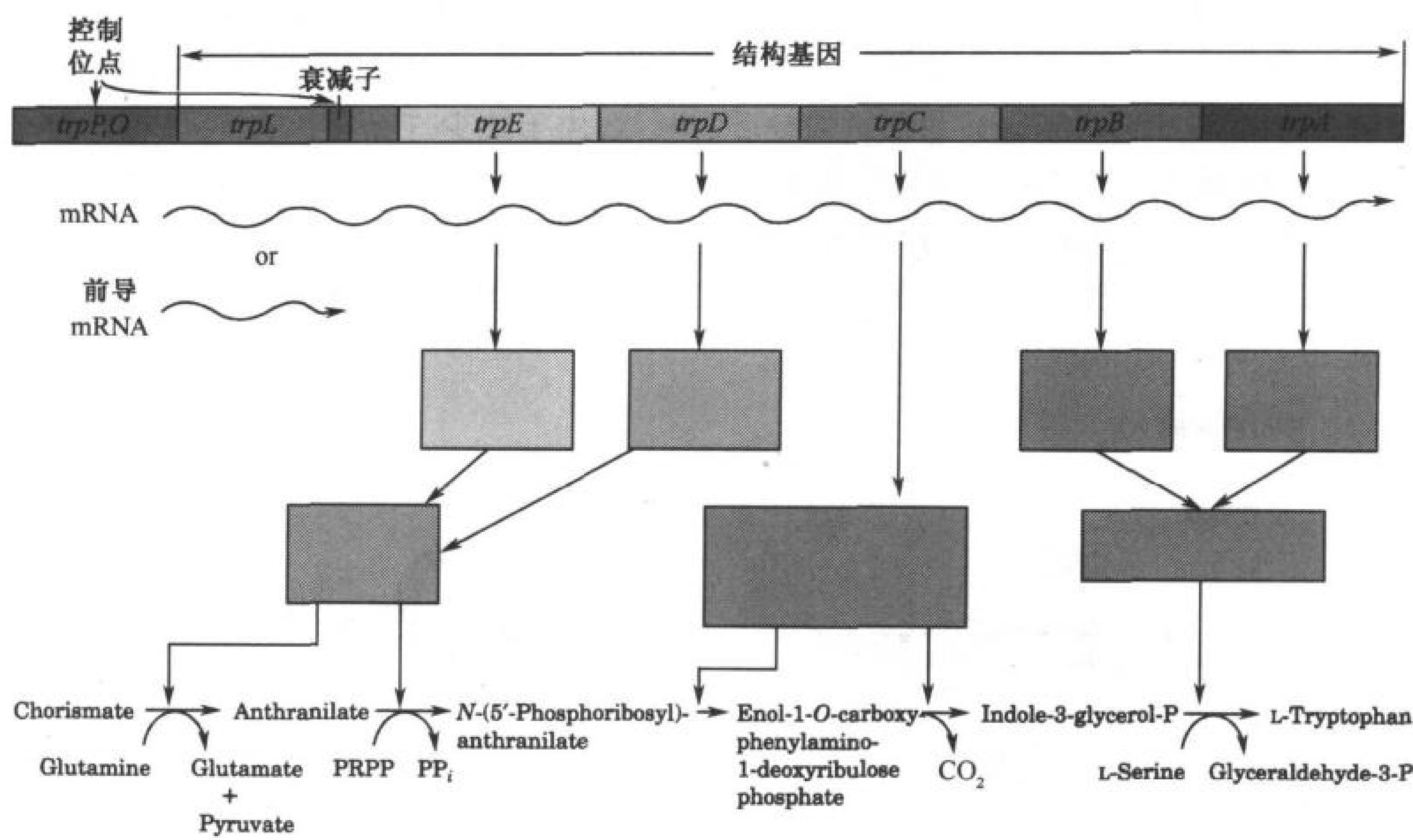


图 27-15　大肠杆菌 *trp* 操纵子基因图谱所确定的酶和它们催化的反应

TrpC 的基因产物在色氨酸的合成中催化两个连续的反应。[引自 Yanofsky C., J. Am. Med. Assoc. 218, 1027(1971)]

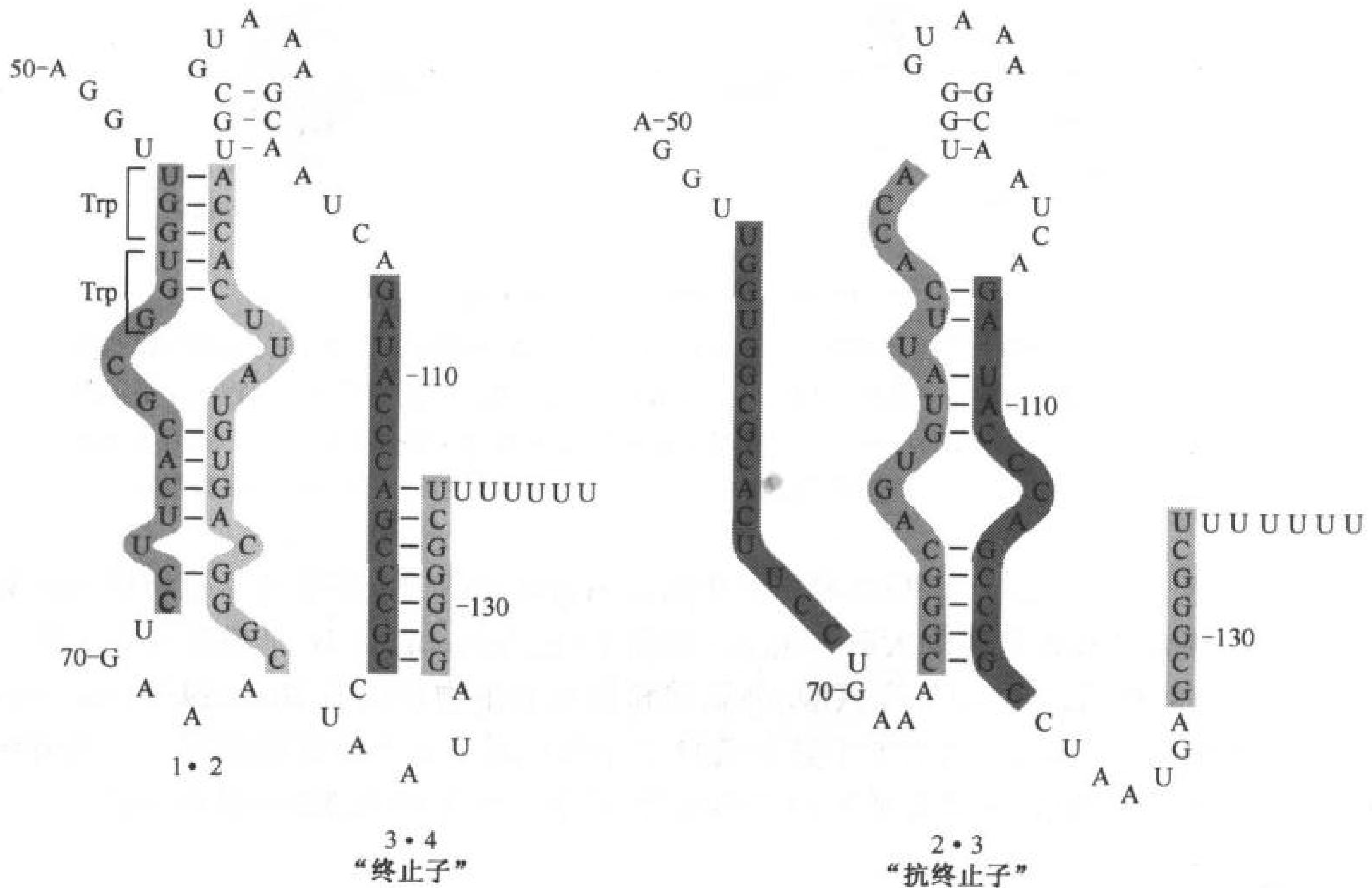


图 27-16　*trpL* mRNA 可选择的二级结构

2·3(抗终止子)碱基对发卡结构的形成(右)阻止了 1·2 和 3·4(终止子)碱基对发卡结构的形成(左),反之亦然。3·4 发卡结构存在时,由于转录会在 140 个核苷酸后立即终止,所以产生衰减作用。箭头表示的是 mRNA 位点,RNA 聚合酶会在此暂停直到结合上核糖体。[引自 Fisher R. F. 和 Yanofsky C., J. Biol. Chem. 258, 8147(1983)]

事实上，RNA 合酶在进行到 92 位点后暂停转录，直到结合上核糖体后重新开始，这样就确保了转录和翻译的紧凑性。结合上的核糖体的前进阻止了 2·3 发卡结构的形成，而允许形成终止转录的 3·4 发卡结构(图 27-17a)。当色氨酸缺乏的时候，由于缺少 *Trp*-tRNA^{Trp}，核糖体停留在连续的两个 UGG 密码子处(UGG 编码色氨酸)。转录继续的时候，由于核糖体的停滞阻止了 1·2 发卡结构的形成，从而形成 2·3 发卡结构。这样导致 3·4 发卡结构不能形成，从而转录可以通过这个区域继续转录 *trp* 操纵子的剩余部分。总之，衰减子根据色氨酸的供应情况而调控操纵子的转录。

901

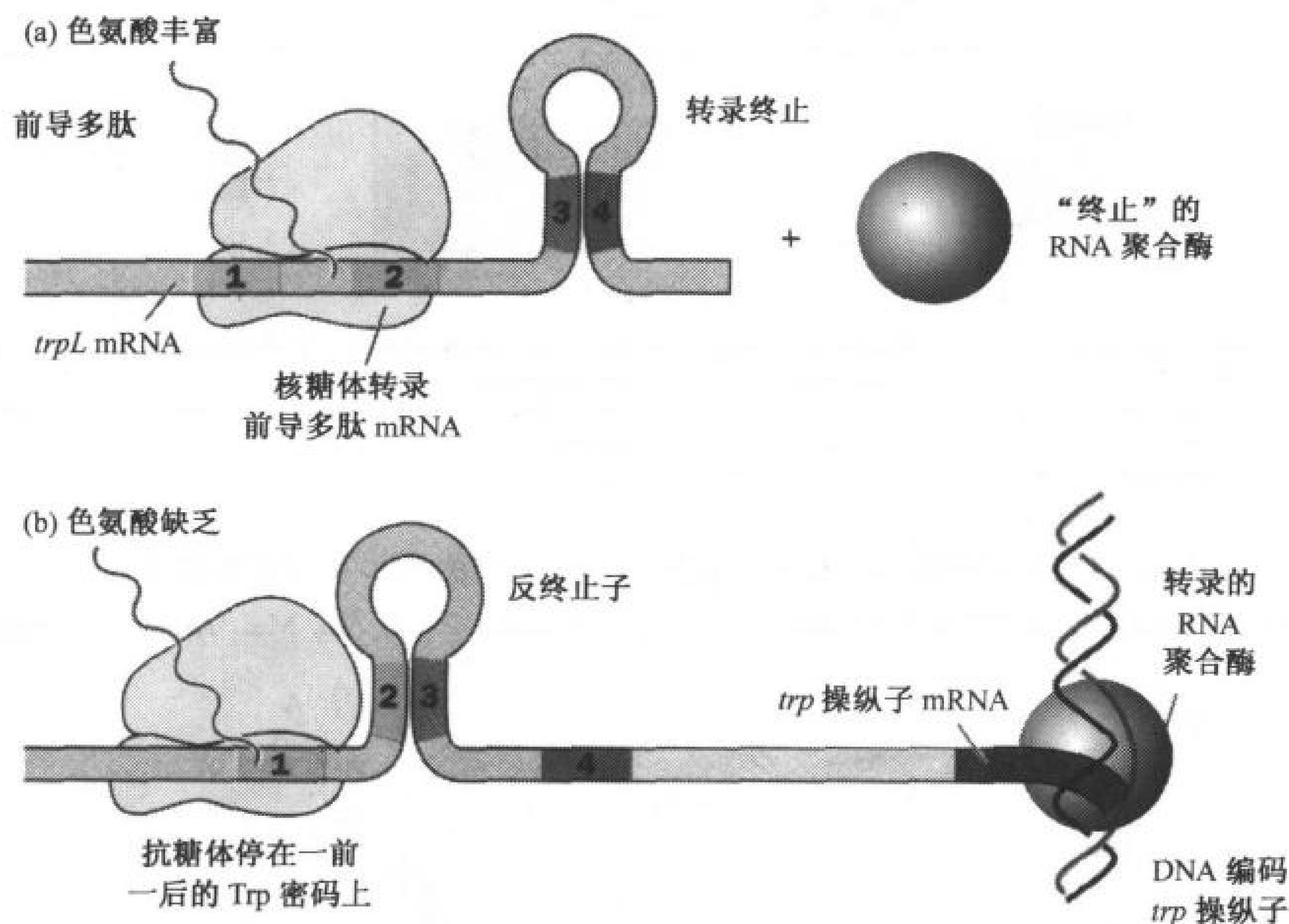


图 27-17 *trp* 操纵子的衰减作用

(a)当 Trp-tRNA^{Trp}丰富时，核糖体翻译 *trpL* mRNA 在片段 2 上的核糖体阻止 2·3 碱基对发卡结构的形成，这样就会形成转录终止子的基本结构——3·4 碱基对发卡结构，而终止了转录。(b)当Trp-tRNA^{Trp}缺乏时，核糖体会停在片段 1 的一前一后的色氨酸密码上，这使得 2·3 发卡结构可以形成，从而不能形成 3·4 发卡结构。RNA 聚合酶可以使转录通过这个没有形成的终止子而转录 *trp* 操纵子。

已知的其他 5 个受衰减子调控的氨基酸生物合成操纵子的前导多肽都含有所调控的氨基酸的大量残基。决定合成组氨酸的大肠杆菌 ***his* 操纵子**(*his* operon)在 16 个残基前导多肽上含有 7 个连续的组氨酸残基，而决定异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸生物合成的 ***ilv* 操纵子**(*ilv* operon)，在它 32 个残基的前导多肽上含有 5 个异亮氨酸、3 个亮氨酸和 6 个缬氨酸残基。这些前导链的转录与 *trp* 操纵子相类似，可以形成两种二级结构，其中之一含有尾端的转录终止子。

D. λ 噬菌体

在分子生物学中了解得最全面的一个调控系统调控着大肠杆菌 λ 噬菌体(图 3-28)的生命循环。在进入宿主不久，长度为 48 502 bp 的线性噬菌体 DNA 环化闭合，它的末端含有 12 个核苷酸的完整单链结构(我们称之为黏性末端或 *cos* 位点)。在这一阶段，病毒可以选择两种生命循环过程：

902

1) λ 噬菌体可以通过宿主以**裂解**(lytic)方式进行复制,结果是,在 37℃ 下 45min 之后,宿主裂解释放出约 100 个噬菌体颗粒的子代。

2) λ 噬菌体也可以以进行**溶原**(lysogenic)方式的生命过程,它的 DNA 插入到宿主染色体的特定部位,被动地和宿主 DNA 一起复制。这时,噬菌体被称为**原噬菌体**(prophage),宿主被称为**溶原性细菌**(lysogen)。在合适的条件下,即使是细菌经过好几代之后,噬菌体 DNA 也可以经诱导脱离宿主 DNA 开始裂解循环。

903

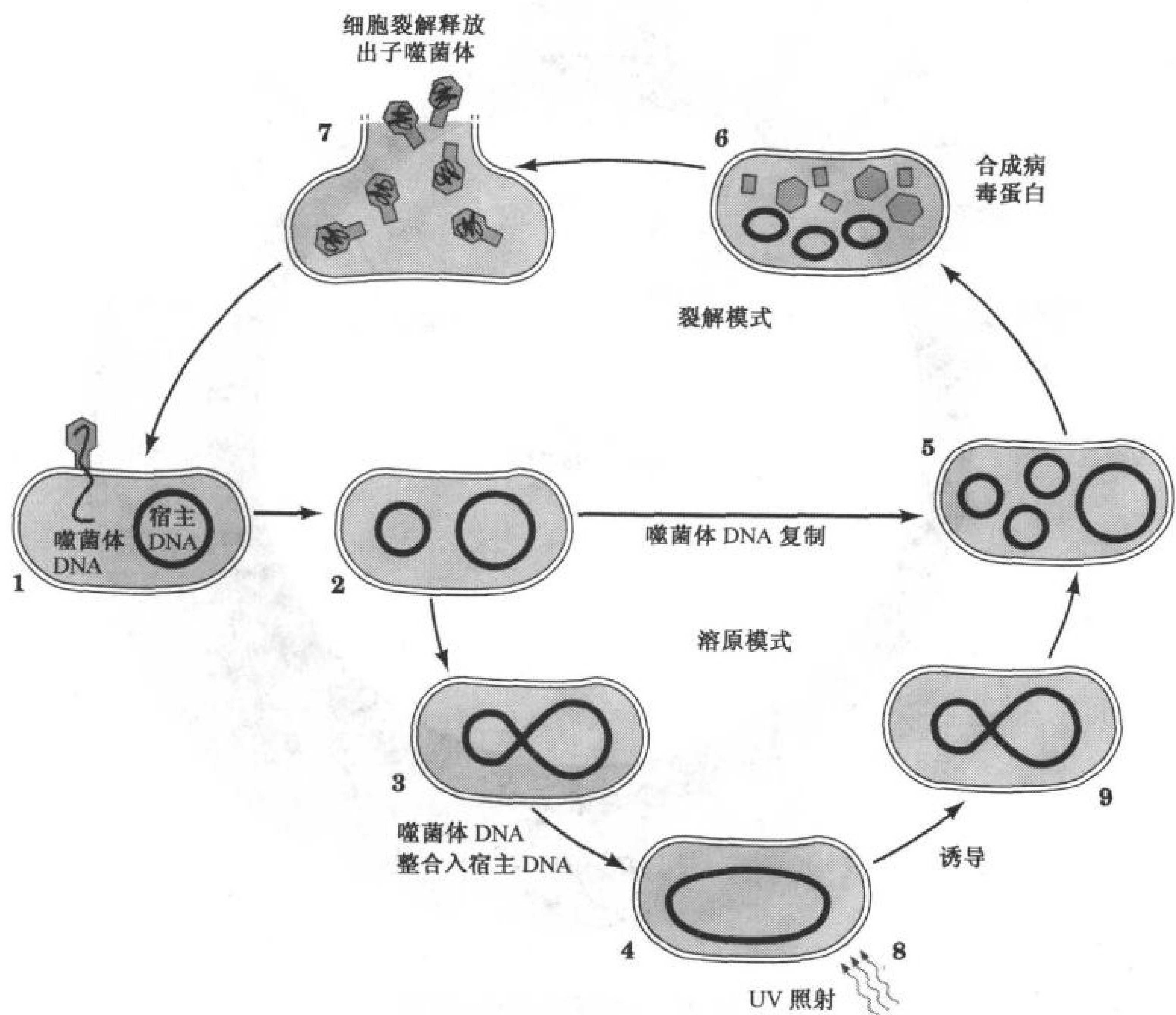


图 27-18　λ 噬菌体的生命循环

病毒附着在细胞上并注入其 DNA 从而造成大肠杆菌宿主的感染(1)线状 DNA 环化(2)开始感染过程。在溶原方式下,噬菌体的 DNA 整合到宿主染色体特定的位点上(3 和 4)。从而被动地和细菌细胞一起复制。另外,噬菌体的 DNA 可以自己进行复制而进入裂解方式(5)生成病毒蛋白质(6),结果造成宿主细胞的裂解并释放约 100 倍的新生病毒(7)。DNA 受损伤时,例如 UV 照射(8)会导致原噬菌体 DNA 结束溶原方式(9)而进入裂解方式。

溶原性复制的优点是明显的:"寄生"状态的噬菌体 DNA 和宿主稳定地结合在一起,比只破坏宿主可以获得更好的存活时间。但是,一旦宿主 DNA 处于损伤状态,噬菌体开始裂解模式,从死亡的宿主中逃脱(这种现象被称作"救生艇"现象)。这种生命循环方式的选择和噬菌体基因的转录调控的复杂机理相关。

裂解途径

λ 噬菌体约有 50 个基因编码蛋白质和大量的控制位点(图 27-19)。λ 噬菌体在裂解复制过

程中，合适的时间选择是关键。这是因为噬菌体 DNA 必须被复制足够的数量以装配入噬菌体颗粒，而且装配过程必须在宿主细胞酶解之前完成。由宿主 RNA 聚合酶完成的 λ 噬菌体基因组转录过程受调控基因（如图 27-19 的红色部分所示）的裂解和溶原两种程序的控制。

裂解转录过程分三个步骤（图 27-20）：

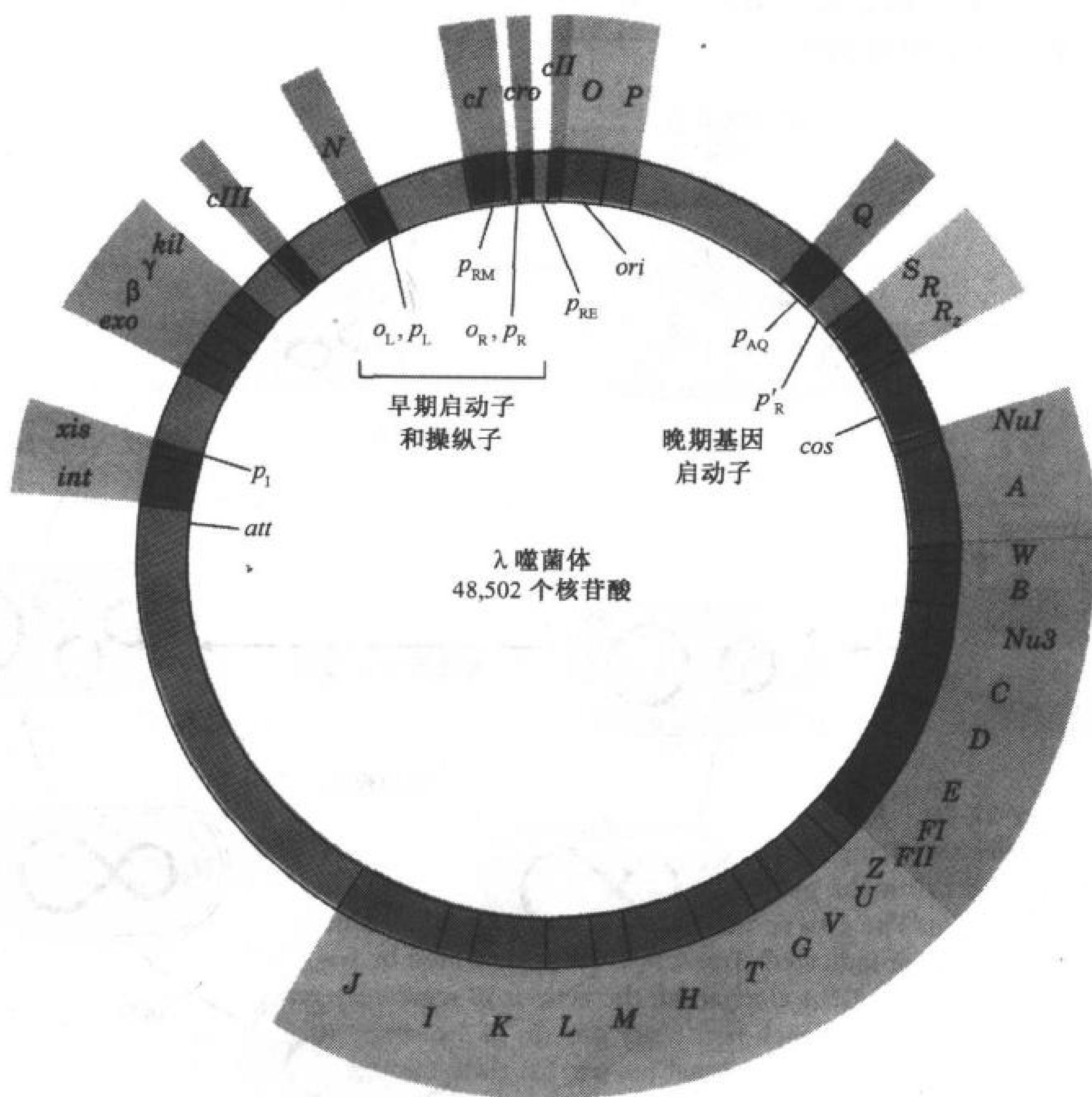


图 27-19　λ 噬菌体的基因图谱

结构蛋白都在环外表明，环内标明的是控制位点。基因编码的调控蛋白为红色阴影响部分。

1）第一阶段，**早期转录**（early transcription），RNA 聚合酶从启动子 p_L 开始左向转录，从启动子 p_R 和 p'_R 开始右向转录（图 27-20a）。在终止位点 t_{L_1} 终止的左向转录本，L1，编码 *N* 基因的产物，gp*N*（gp 指的是基因产物）。从 p_R 开始的右向转录 50% 在 t_{R1} 终止，产生 R1 转录本，否则在 t_{R2} 终止，产生 R2 转录本。R1 仅仅编码 **Cro 蛋白**（Cro protein）（*cro* 基因的产物，如下所示），而 R2 还会编码 cII（*cII* 基因产物，如下所示）、gp*O* 和 gp*P*（它参与 λDNA 的合成）。从 p'_R 开始的右向转录在 t'_R 终止，产生短转录本 R4，并不编码任何蛋白。

2）第二阶段，**延迟早期转录**（delayed early transcription），当有相当数量的 gp*N* 累积时开始。这种蛋白在终止位点 t_{L1}、t_{R1} 和 t_{R2} 处起**转录反终止子**（transcriptional antiterminator）的作用，从而产生延长的 L2 和 R3 转录本（图 27-20b）。L2 编码将 λDNA 从大肠杆菌染色体切除的蛋白（*xis* 和 *int* 基因的产物），而 R3 既编码 gp*O*、gp*P* 和 Cro 蛋白，也编码转录反

终止子 gp$Q$。最后,阻遏物 Cro 蛋白,积累并抑制从 p_L 和 p_R 的转录(Cro 代表对阻遏物和其余部分的控制)。

3)**晚期转录**(late transcription),gp$Q$ 积累到一定程度,防止转录在 t'_R 处终止(图 27-20c)。产生的转录本 R5 编码包括形成噬菌体衣壳的蛋白和催化宿主细胞裂解的蛋白。

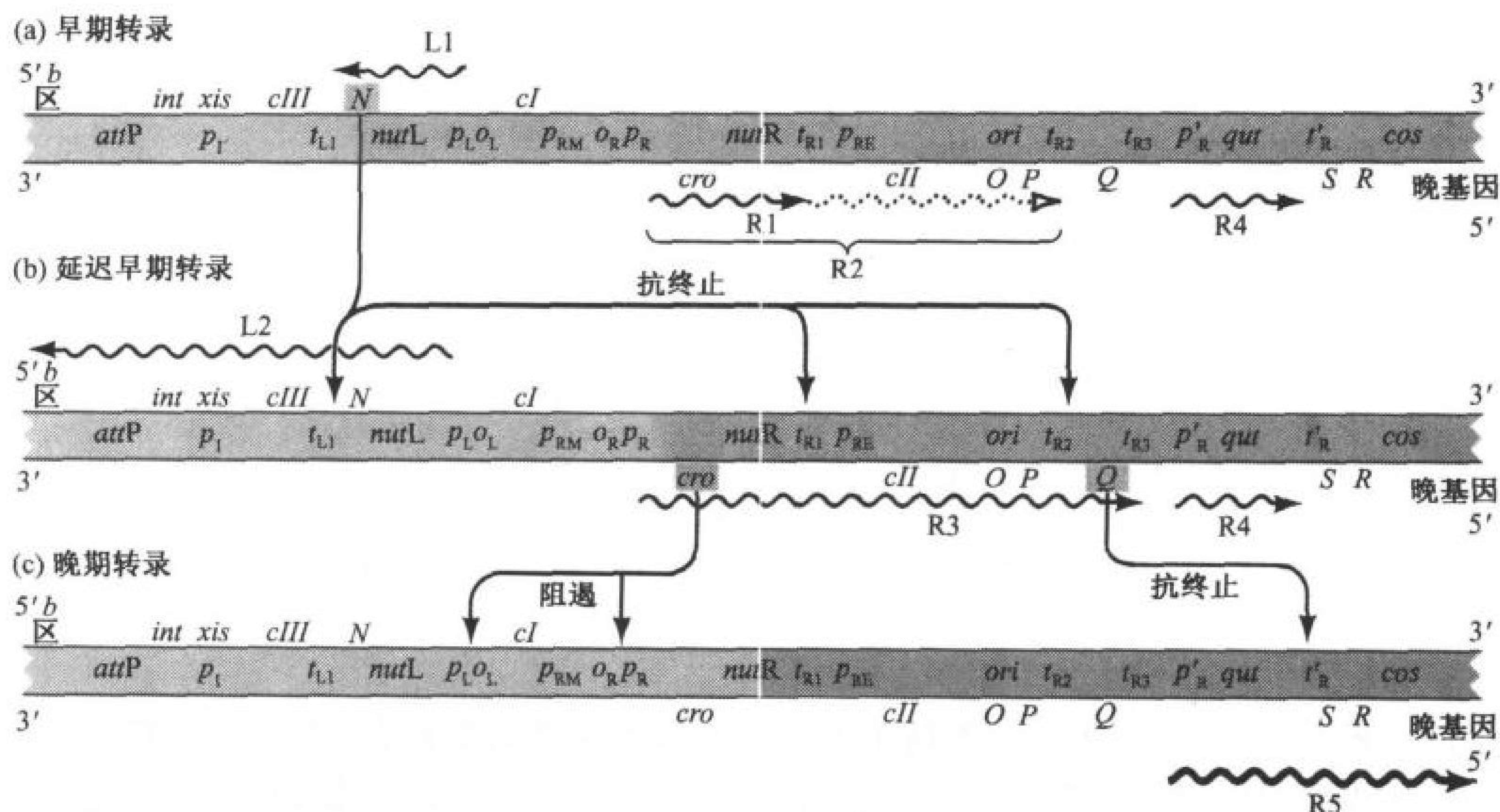


图 27-20　*功能的秘诀*:λ 噬菌体裂解方式的基因表达

向"左"和向"右"转录的基因确定的蛋白质分别标明在染色体的上方和下方。控制位点在 DNA 链之间标出。这个基因图谱是不详细的,没有标出所有的基因和控制位点。转录用波浪箭头表示,并表明 mRNA 的行进方向;调控蛋白的作用由箭头指明,从调控蛋白指向它的作用位点。裂解过程分三个转录阶段(a)早期转录。(b)延迟早期转录和(c)晚期转录。后两个阶段的基因表达受到之前阶段合成的蛋白质的调控作用,如同文中所述。[引自 Arber, W., Hendrix, R. W. Roberts, J. W., stahl, F. W.,和 Weisberg, R. A.(Eds.), Lambda Ⅱ, p.389, Cold Spring Harbor Laboratory(1983)]

这三阶段中的第二和第三阶段表达基因,而且每一个阶段均受之前阶段合成蛋白的调控,以确保有效地生成新的噬菌体颗粒。这一过程大约在感染后的 22min 左右发生。

gp$N$ 的反终止效应依赖于在 RNA 转录中一种碱基配对的小发卡结构的形成,这种发卡结构在 p_L 左端的 *nut* 位点(*nut*L)或 p_R 右端的 *nut* 位点(*nut*R)形成。这些位点具有类似的含有 *box*A 和 *box*B 的序列(图 27-21a)。反终止效应还需要几种大肠杆菌蛋白的参与,它们在 mRNA 的 *nut* 位点与 RNA 聚合酶和 gp$N$ 形成复合物。这种复合物伴随着 RNA 聚合酶前进,防止聚合酶在终止位点 t_{L1}、t_{R1}或 t_{R2}处停止(前两者是 rho 依赖的,见节 25-1D;后者是非 rho 依赖的)。

gp$Q$ 结合在 p'_R 下游的 *qut* 位点。*qut* 和 *nut* 一样,形成 RNA 发卡结构(图 27-21b),但是 gp$Q$ 结合在 DNA 上而不是结合在 RNA 上,与一种宿主蛋白共同诱导 RNA 聚合酶通过 t'_R 终止位点形成更长的 RNA 转录本 R5(图 27-20c)。

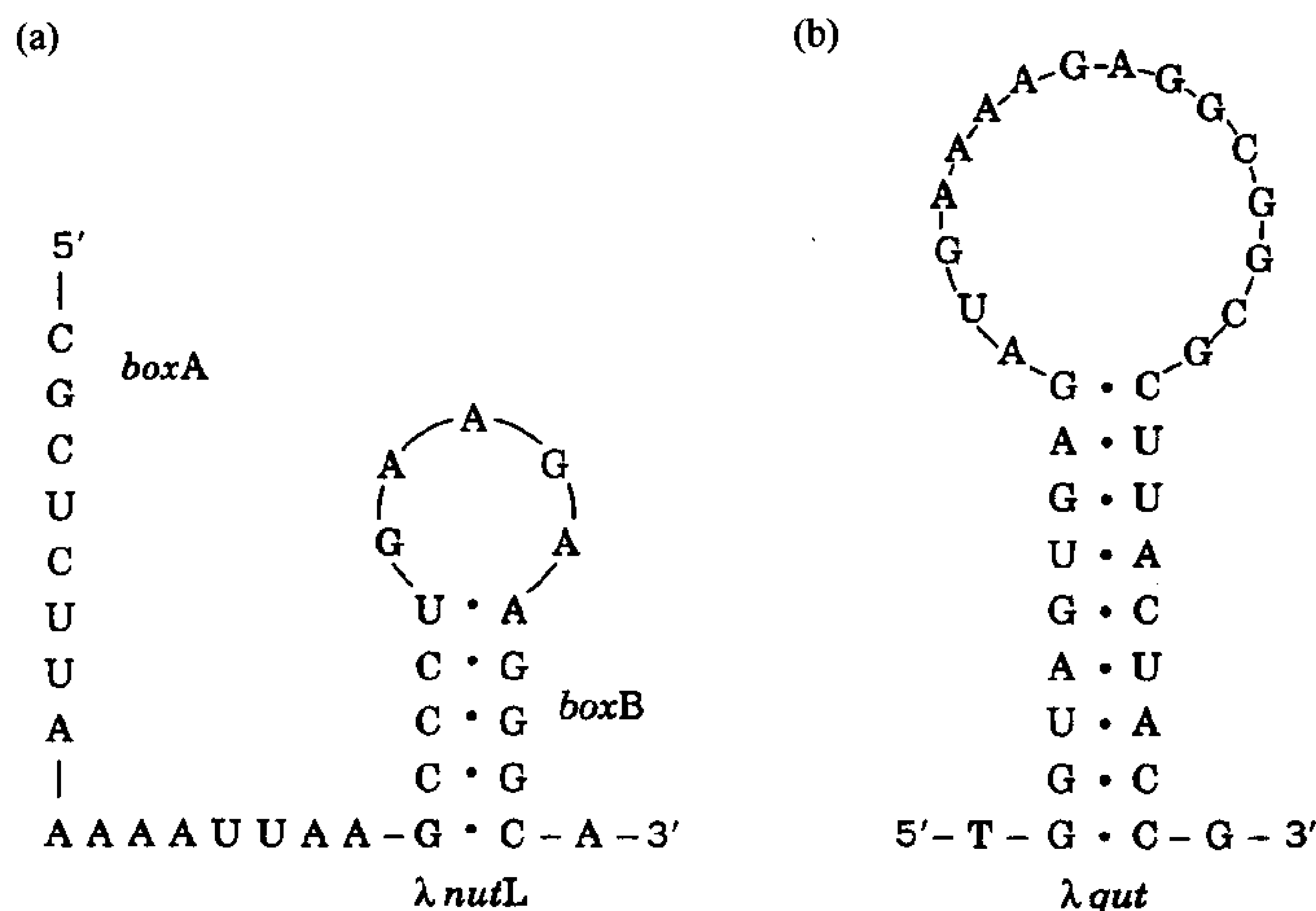


图 27-21 λ 噬菌体控制位点的 RNA 序列

(a) *nutL*,这一位点与 *nutR* 很类似。(b) *qut*,每一个这种控制位点都会形成碱基对发卡结构。

溶原途径

溶原过程是指病毒 DNA 整合入宿主染色体而所有的裂解基因表达停止。λ 噬菌体的整合是**位点特异性重组**(site-specific recombination),它不同于普通的重组(节 24-6A),它是发生在噬菌体的 *att*P 区域和宿主染色体的 *att*B 区域之间(图 27-22)。这两段区域有相同的 15bp 的序列,可以分别表示为 POP′(*att*P)和 BOB′(*att*B),其中 O 是相同序列。噬菌体整合是通过在"左侧"的 *att*L 位点形成 BOP′序列,"右侧"的 *att*R 位点形成 POB′序列,将噬菌体的 DNA 插入染色体中。^{32}P 标记的细菌 DNA 和未标记的噬菌体 DNA 的整合研究确定了交叉位置的自然状态:在每一条链的特定位置上,原来的互补链均被相应的互补部分所取代,从而形成相错的互补连接(图 27-23,底部)。

噬菌体的整合由**整合酶**(integrase)引发,这种酶是 *int* 基因的产物,相当于 I 型拓扑异构酶:在双链 DNA 的一条链上打开缺口并通过缺口重新连接(节 23-1C)。在原噬菌体从宿主 DNA 逸出的过程中,整合酶和**切除酶**(excisionase, *xis* 基因的产物)合作进行裂解过程。

溶原过程的建立由高浓度的 cII 触发,这个蛋白诱发从启动子 p_I(I:整合)和 p_{RE}(RE:阻遏物的建立;图 27-20)起始转录。p_I 位于 *xis* 基因中,从它开始的转录合成整合酶,但并不合成切除酶。λDNA 从而整合入宿主染色体。之所以溶原过程需要高浓度的 cII 是因为只有当这个早期基因产物在寡聚状态下才能引发从 p_I 和 p_{RE}起始的转录。因此,如果噬菌体与感染细菌的比例很高(而且 cII 以很高的速度合成),对溶原过程是有利的,这样可以防止大量的噬菌体杀死宿主细胞。

从 p_{RE}起始的转录包含了 ***cI*** 基因,这一基因编码 **λ 阻遏物**(或称作 ***cI* 阻遏物**)。这种蛋白和 Cro 蛋白一样,抑制从 p_L 和 p_R 起始的转录,从而停止裂解过程中必需的早期基因产物的合成。λ 阻遏物同时引发从 p_{RM}(RM:阻遏物维持)位点起始的自身基因的转录。λ 阻遏物的持续合成维持了噬菌体一代代地以溶原方式进行复制。

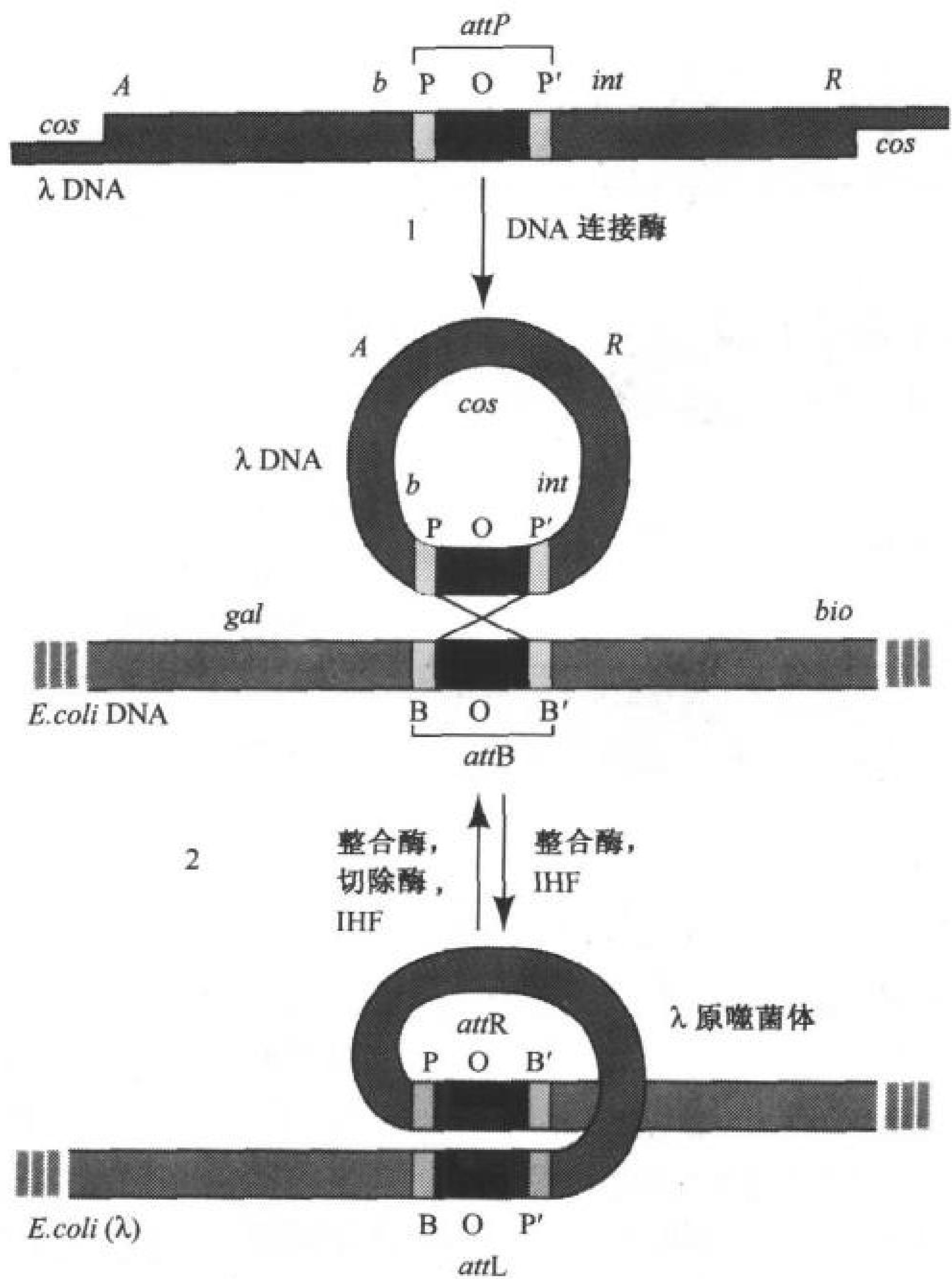


图 27-22 λ 噬菌体的位点特异性重组

这个示意图表明(1)噬菌体 DNA 通过互补末端 *cos* 位点的碱基配对而环化(2)将噬菌体 DNA 整合到/切割出宿主染色体是通过噬菌体 DNA 上的 *att*P 位点和宿主细胞上的 *att*B 位点的位点特异性重组来实现的。*att* 位点上的深色部分表明相互间同源的 15bp 的序列(O),浅色区域表明细菌的特有序列(B 和 B′)和噬菌体的特有序列(P 和 P′)。这一过程需要**整合宿主因子**(IHF)的参与,它是一种类似组蛋白的大肠杆菌蛋白质,它可以特异地结合在 *cos* 位点上使 DNA 产生明显的弯曲。[引自 Landy, A. 和 Weisberg, R. A., Hendrix, R. W., Roberts, J. W., Stahl, F. W., and Wers-berg, R. A. (Eds.), Lambda Ⅱ, p.212, Cold Spring Harbor Laboratory(1983)]

λ 遗传开关

Cro 蛋白(抑制所有 λ mRNA 的合成)和 λ 阻遏物(引发自身基因的转录,抑制其他 λmRNA 的合成)的区别是决定进行裂解过程还是溶原过程的遗传开关的基础。Mark Ptashne 对这种遗传开关的机理做了主要的阐述,指出这一机理是在抑制裂解过程或者保持有效的裂解过程之间的一种很好的协调作用。即在通常的情况下,溶原过程在自然状态只能诱发 $1/10^5$ 细胞裂解,但是诱发环境的短暂出现就可以使几乎所有溶原状态的细胞转变为裂解生长。

λ 开关主要作用在 o_R 操纵基因上(图 27-20)。$\boldsymbol{o_R}$ 操纵基因处在 p_{RM}和 p_R 之间,包括三个亚单位,分别为 o_{R1}、o_{R2}和 o_{R3}(图 27-24)。每一个亚单位都含有类似的 17bp 片段形成的对称回文序列。

λ 阻遏物的同型二聚体结合在 DNA 上,它的二重轴对称结构与操纵基因亚单位的对称结构 908

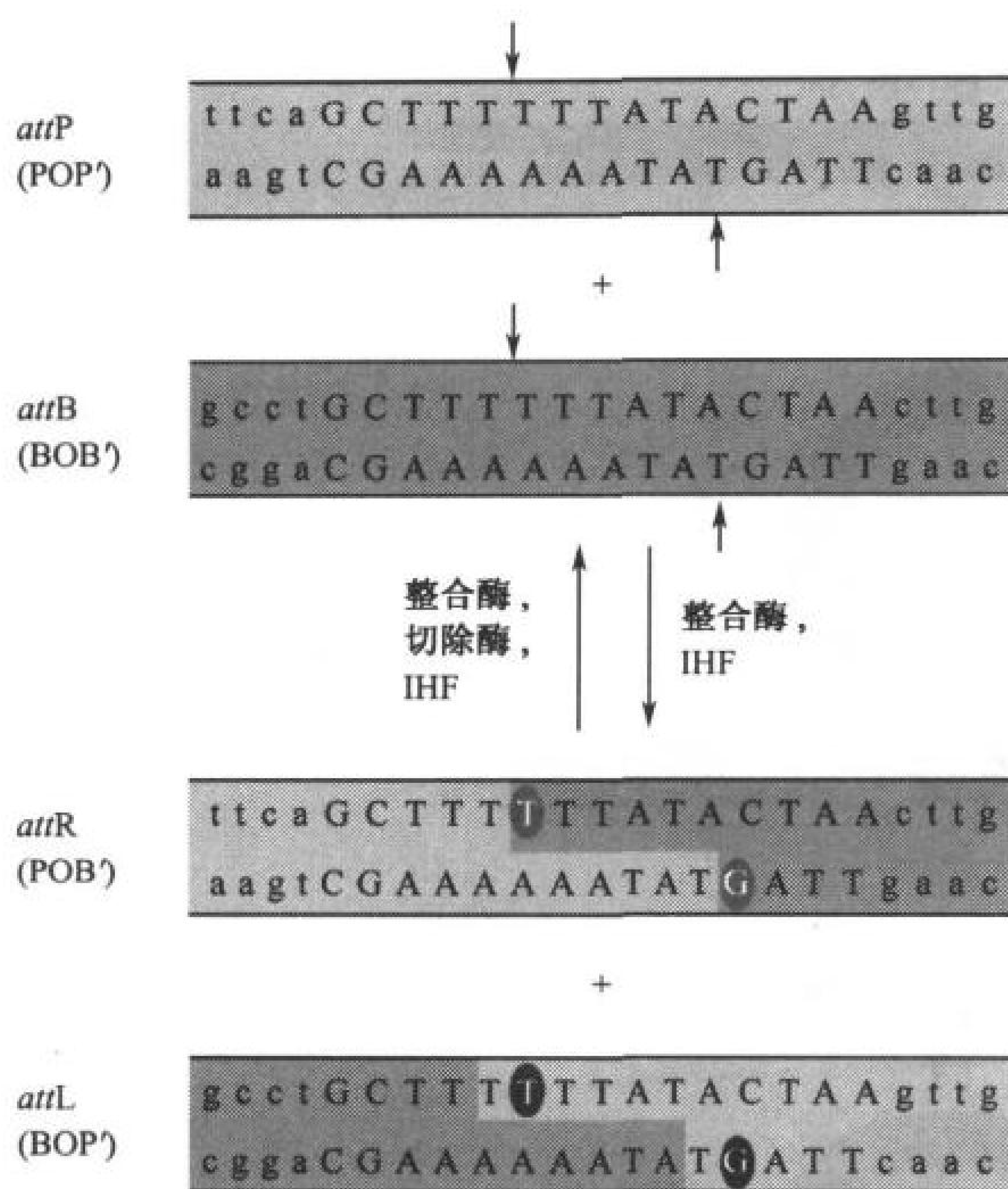


图 27-23 将 λ 噬菌体的 DNA 整合入/切割出大肠杆菌染色体的位点特异性重组过程

变换发生在噬菌体的 *att*P 位点(红色)和细菌的 *att*B 位点(蓝色)，以及原噬菌体的 *att*L 和 *att*R 位点上。短的蓝色箭头指明的是链发生断裂的位点。*att*R 和 *att*L 中更深色的碱基的来源还不很确定。高亮字母的碱基是噬菌体和细菌共有的，而较暗的碱基则是 B、B′、P 和 P′的侧翼位点上的

相匹配。单体的 236 残基多肽链折叠成两个大小相等的结构域。这两个结构域由一个易被蛋白水解酶剪切的约 30K 残基的片段连接。游离的 N 端结构域可以特异地与操纵基因结合(尽管结合能力只有完整阻遏物的一半)，但是不能形成二聚体。游离的 C 端结构域可以形成二聚体但不能结合 DNA。显然，λ 阻遏物的 N 端结合操纵基因而 C 端形成二聚体。

尽管没有得到过 λ 阻遏物的结晶体，但是经**木瓜蛋白酶**(papain)处理得到的含有 1～92 个残基的片段可以结晶。Carl Pabo 确定了这个蛋白片段独自的和与含有操纵基因亚单位序列的 20bp DNA 结合后的 X 射线衍射结构。结果显示，N 端片段形成对称的二聚体结晶，尽管在溶液中没有形成二聚体。每一个亚基都含有一个 N 端臂和 5 个 α 螺旋(图 27-25)，其中的 α_2 和 α_3 形成螺旋-转角-螺旋(HTH)结构，这和其他已知的原核生物阻遏物的结构类似(节 23-4B)。作为识别螺旋，α_3 螺旋从蛋白的表面突出，这样二聚体蛋白的两个 α_3 螺旋可以很好地匹配在操纵基因 DNA 的连续凹槽中。

Cro 蛋白也形成同型二聚体。它的 66 个残基亚基形成一个既含有二聚体接触位

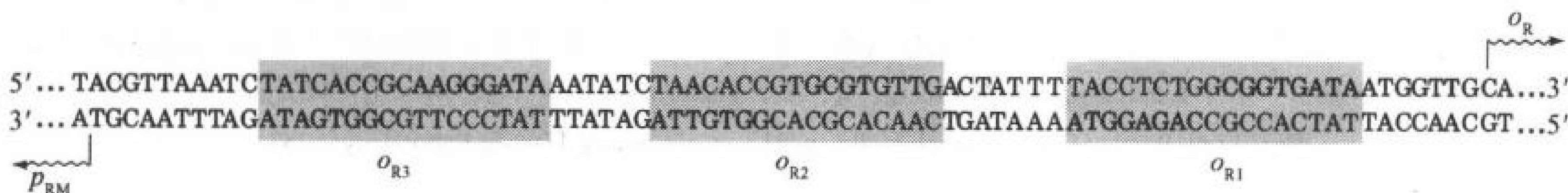


图 27-24 λ 噬菌体染色体 o_R 区的碱基序列

这一操纵子含有三个相似的 17bp 的亚单位，它们中间有短的富含 AT 的间隔。如果比较每个亚单位的红色字母部分会发现每一个亚单位都有大致相同的回文对称结构。波浪箭头表明转录起始位点并指明相应启动的方向。

点又含有操纵基因识别位点的区域。Brian Mathews 确定了和操纵基因 DNA 形成复合物的 Cro 蛋白的 X 射线衍射结构(图 27-26)，这一结构表明 Cro 蛋白二聚体和 λ 阻遏物一样通过 HTH 结构与 DNA 结合，它的结合还使 DNA 围绕蛋白二聚体扭曲 40°。

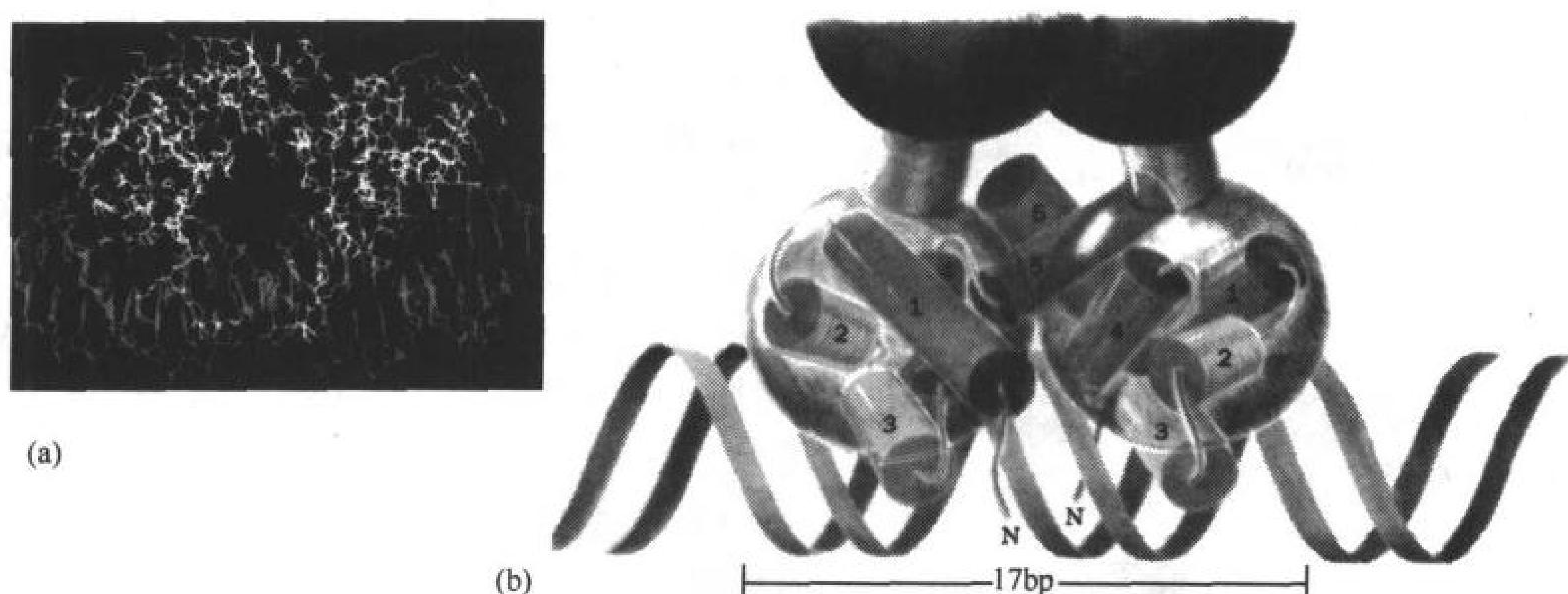


图 27-25　λ阻遏物二聚体 N 末端区域与 B-DNA 形成的复合物的 X 射线结构图

(a)复合物用棒状表示法，其中 DNA 是蓝色的，两个抑制因子的 N 末端区域分别为黄色和白色，HTH 结构的识别螺旋为红色。注意蛋白质的 N 末端臂缠绕着 DNA。(引自 Carl Pabo, The Johns Hopkins University)(b)示意图表明抑制因子 C 末端之间(上面的圆形，不是 X 射的结构部分)的结合是如何能保持蛋白质的二聚性质的。λ抑制因子以对称二聚体的方式与 17bp 操纵子亚单位结合，每一个亚单位的 N 末端都特异性的结合上一个半亚单位。注意 X_2-X_3HTH 结构(浅黄)的 X_3 识别螺旋是如何适应 DNA 大沟的连续凹槽的。[引自 Ptashne, M., A Genetic Switch (2nd ed.), p.38, Cell Press & Blackwell suentific PubLications(1992)]

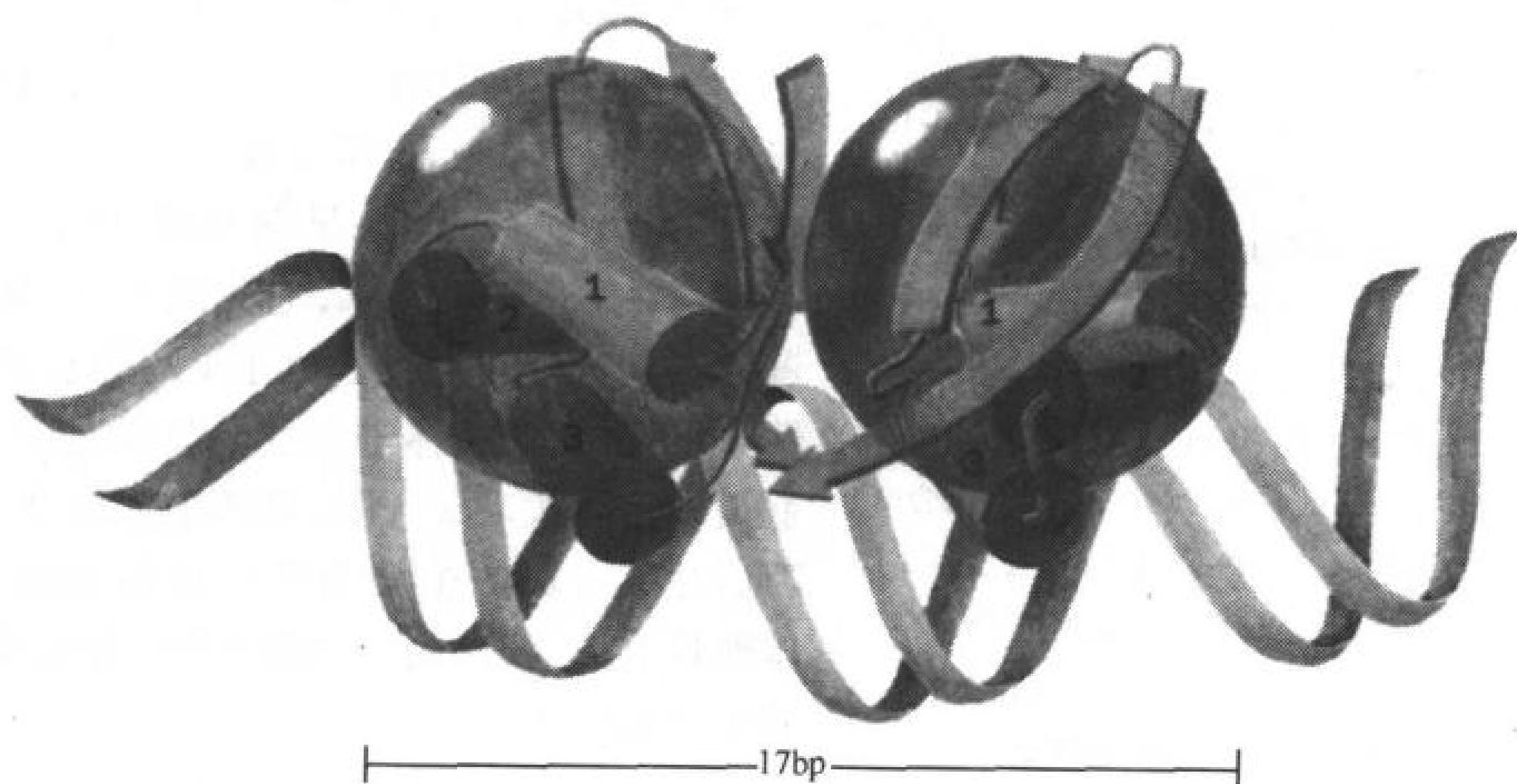


图 27-26　Cro 蛋白二聚体与 B-DNA 形成的复合物的 X 射线结构图

注意比较λ抑制因子(图 27-25)，尽管有此不同，但也同样是 HTH 结构与 DNA 大沟的连续凹槽相结合。[引自 Ptashne, M., A Genetic Switch(2nd ed.), p.40, Cell Press & Blackwell Scientific Publications(1992)]

化学保护和核酸酶保护实验表明，λ阻遏物与 o_R 亚单位的内在的亲和力存在如下顺序(图 27-27)：　909

$$o_{R1} > o_{R2} > o_{R3}$$

尽管顺序如此，但 o_{R1}和 o_{R2}的加载是同时的。这是因为 C 端区域的结合使得λ阻遏物二聚体和 o_{R1}、o_{R2}的结合是协同的(图 27-27c)。这样 o_{R1}和 o_{R2}在λ阻遏物低浓度时就被占据而 o_{R3}只在阻遏物高浓度时才被占用。

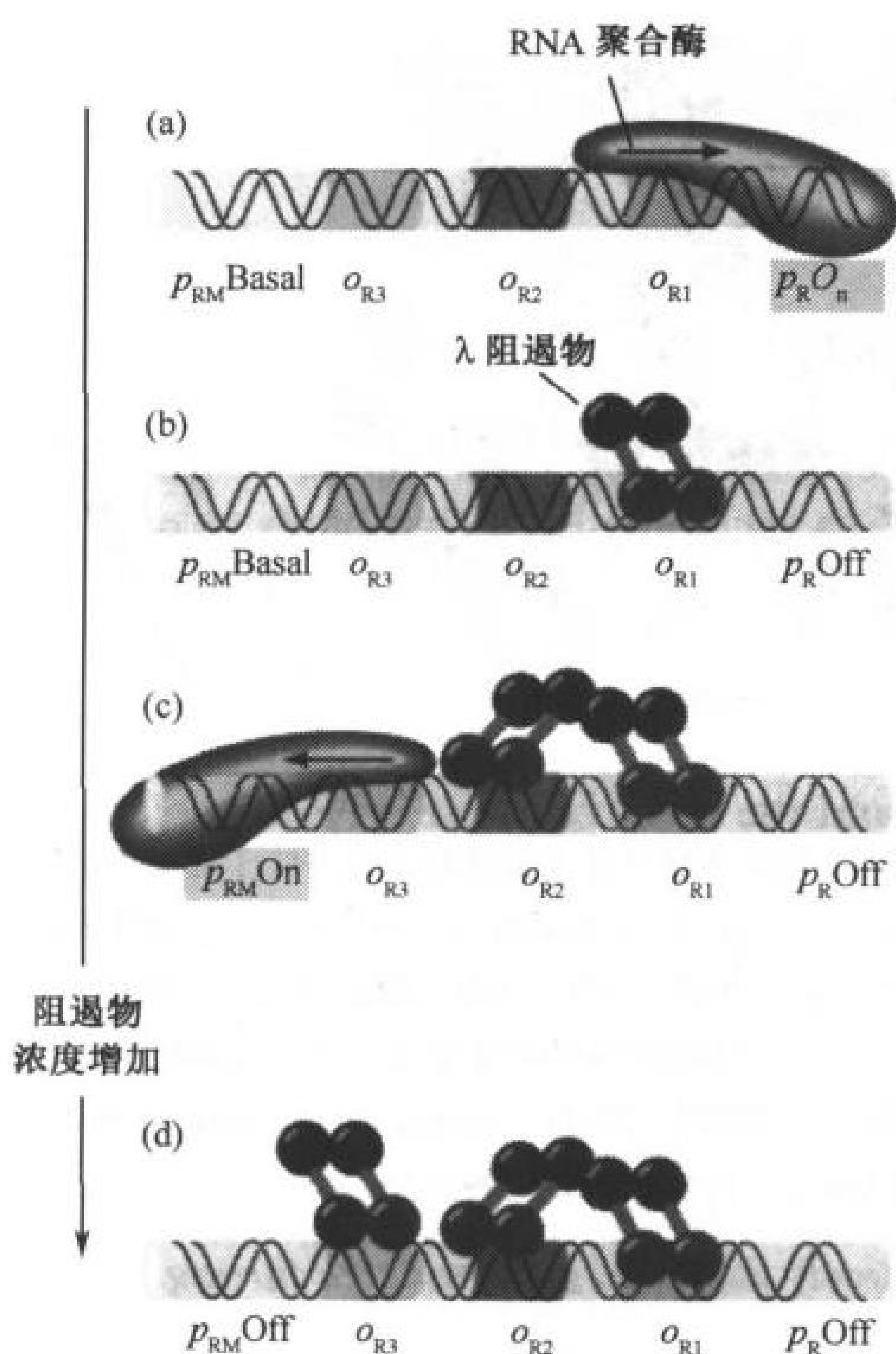


图 27-27 λ 抑制因子结合上 o_R 的三个亚单位

(a)缺乏抑制因子时,RNA 聚合酶从 p_R(右)开始很高效地转录,而在 p_{RM}进行基础水平上的转录。(b)抑制因子与 o_{R1}的亲和力是 o_{R2}和 o_{R3}亲和力的约 10 倍,因而抑制因子二聚体首先结合上 o_{R1}阻止从 p_R 的转录。(c)当抑制因子浓度稍高时,由于相邻抑制因子间 C 末端的特异性结合使第二个抑制因子二聚体结合上 o_{R2},这样使 RNA 聚合酶开始从 p_{RM}(左)的高效转录。(d)在抑制因子浓度很高时,抑制因子结合上 o_{R3}从而阻止了从 p_{RM}的转录。[引自 Ptashne, M., Genetic Switch(2nd ed.), p. 23, Cell Press & Blackwell Scientific Publications(1992)]

910

如前所述,λ 阻遏物与 o_R 的结合阻止了从 p_R 起始的转录而引发从 p_{RM}起始的转录。由于结合在 o_{R2}的阻遏物直接与 RNA 聚合酶接触,从而帮助聚合酶结合到 p_{RM}(图 27-27c),导致了这种引发作用。这样,**λ 阻遏物阻止了除它自身以外的其他噬菌体基因产物的合成**。当 λ 阻遏物的浓度很高时,从 p_{RM}开始的转录也被抑制(图 27-27d),这就保证阻遏物维持在合理的限制浓度内。

Cro 蛋白结合 o_R 亚单位的亲和力顺序与 λ 阻遏物相反(图 27-28):

$$o_{R3} > o_{R2} \approx o_{R1}$$

这种结合是非协同的。Cro 蛋白结合在 o_{R3}上,停止了从 p_{RM}起始的转录,从而抑制了 λ 阻遏物的合成。另外,Cro 蛋白结合上 o_{R2}或 o_{R1}关闭了从 p_R 起始的转录。因而,裂解性或溶源型生长的选择依赖于是何种抑制子占据了 o_R 亚单位。

DNA 的损伤会引发大肠杆菌的 SOS 反应(节 24-5C),导致 RecA 活化。这种蛋白促进 λ 阻遏物在 N 端和 C 端区域间的自剪切,从而使 λ 阻遏物失去了对 o_{R2}的协同作用能力。这种 λ 阻遏物结合 o_R 能力的减弱允许早期基因,包括 *cro* 基因的转录。当 Cro 蛋白积累,它先结合 o_{R3}阻止了 λ 阻遏物基础水平的合成。由于 Cro 蛋白不存在选择性失活,因此噬菌体进入裂解过程是不可逆的,也就是说一旦拨动 λ 开关,就不能重置了,原噬菌体随后被新合成的整合酶和剪切酶切除,新的噬菌体颗粒合成,损伤的宿主被裂解,释放噬菌体颗粒感染新的宿主。

3. 真核基因表达调控

原核基因表达的基本原理同样应用于真核基因:**通过结合到 DNA 或 RNA 的蛋白的作用阻止或引发特定基因的表达**。同在原核生物中一样,已知的最主要的真核调控机理是发生在转录水平的,但是与原核调控系统不一样的是,真核调控机理必须适应大量 DNA 聚集且不易接触的结构特点。在这一节里,我们将介绍一些真核细胞对其遗传信息的调控。

911

A. 染色质结构和基因表达

在多细胞真核生物中有大量的 DNA 不被转录。这其中包括基因组中大量的不编码蛋白或 RNA 的部分,也包括那些在特定细胞中不适合表达的基因。虽然一种生物体中几乎所有的细胞

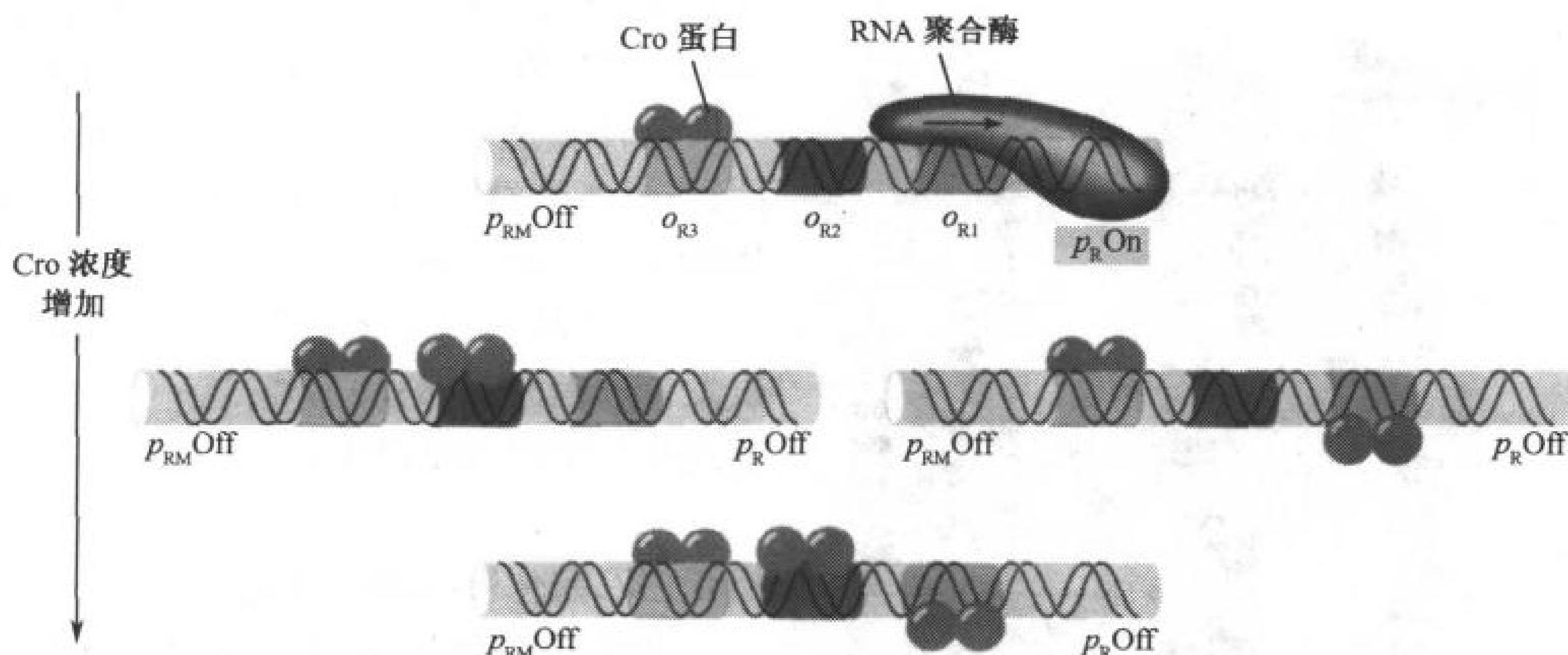


图 27-28　Cro 蛋白结合上 o_R 的三个亚单位

o_{R3}结合 Cro 要比 o_{R1}和 o_{R2}紧密约 10 倍。这样 Cro 二聚体首先结合 o_{R3}。第二个二聚体结合上 o_{R1}或 o_{R2}，无论如何都能阻止从 p_R 的转录。当 Cro 浓度很高时，三个操纵子亚单位都被占据。比较一下这种结合顺序与 λ 抑制因子的情形(图 27-27)。[引自 Ptashne, M., A Genetic Switch(2nd ed.), p.27, Cell Press & Blackwell Scientific Publications(1992)]

含有相同的 DNA，但基因的表达却有很高的组织特异性。例如，大部分胰腺细胞合成并分泌消化酶而胰岛细胞却合成胰岛素和胰高血糖素(节 21-3A)。

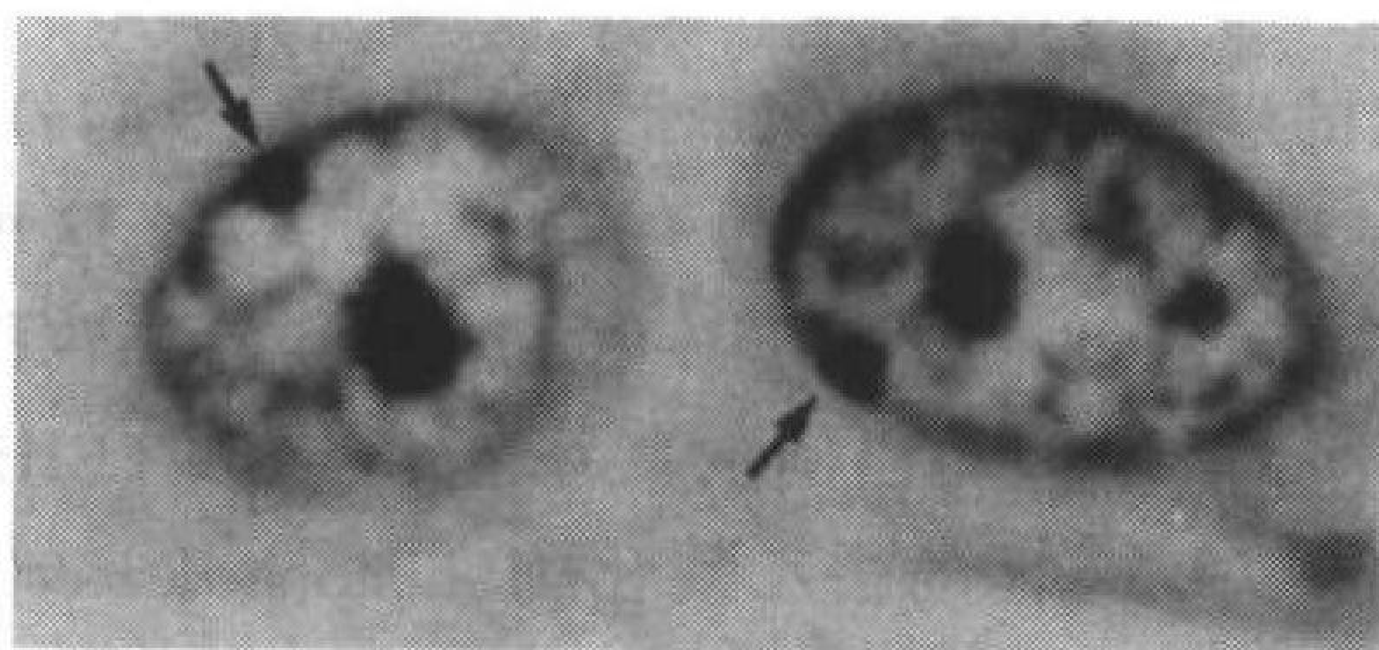


图 27-29　巴尔体

每一个染色的核外周的深色区域(箭头所指)就是巴尔体，即浓缩了的 X 染色体。(引自 George Wilder/Visuals Unlimited)

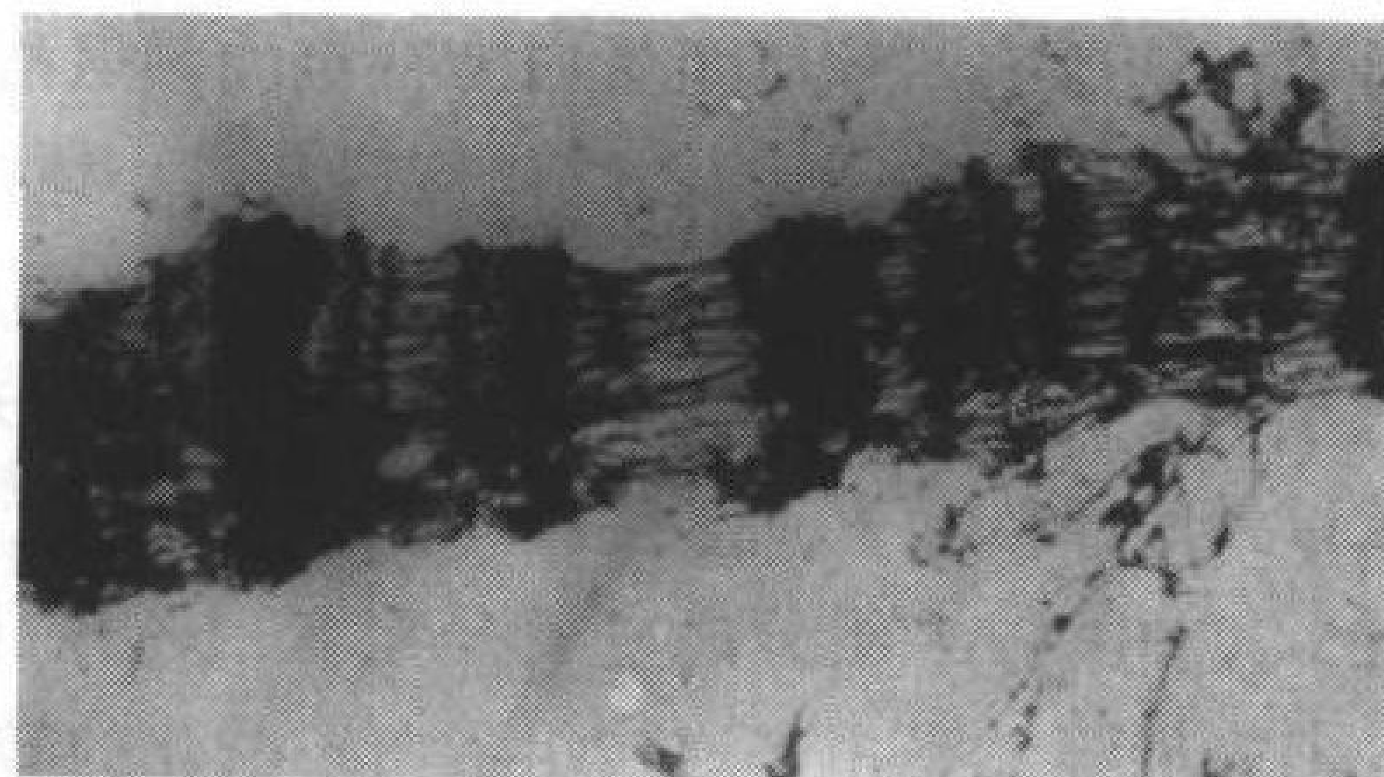


图 27-30　*D. Melanogaster* 的多线染色体电镜图

注意连接部分含有的染色质纤维大致与染色体的长日轴平行，而含有约 95% 的染色体 DNA 带状结构是更加高度浓缩的。(引自 Gary Burkholder, University of Saskatchewan, Canada)

不表达的 DNA 特异地高度浓缩在一起形成**异染色质**(heterochromatin)。一个极端的例子是在雌性哺乳动物中，两个 X 染色体之一完全没有活性，在细胞核中以黑色的**巴尔体**(Barr body)形式存在(图 27-29)。转录活泼的 DNA[(**常染色体**(euchromatin)]浓缩程度低，大概是为了与转录机器的接触。事实上，Harold Weintrawb 证实，转录活跃染色质比转录非活跃染色质更容易受胰腺 DNase I 的作用。然而，核酸酶敏感性显然反映的是基因转录的潜在性而非转录本身。

双翅昆虫**多线染色体**(polytene chromosome)条带图形的建立可以反映非转录 DNA 的选择

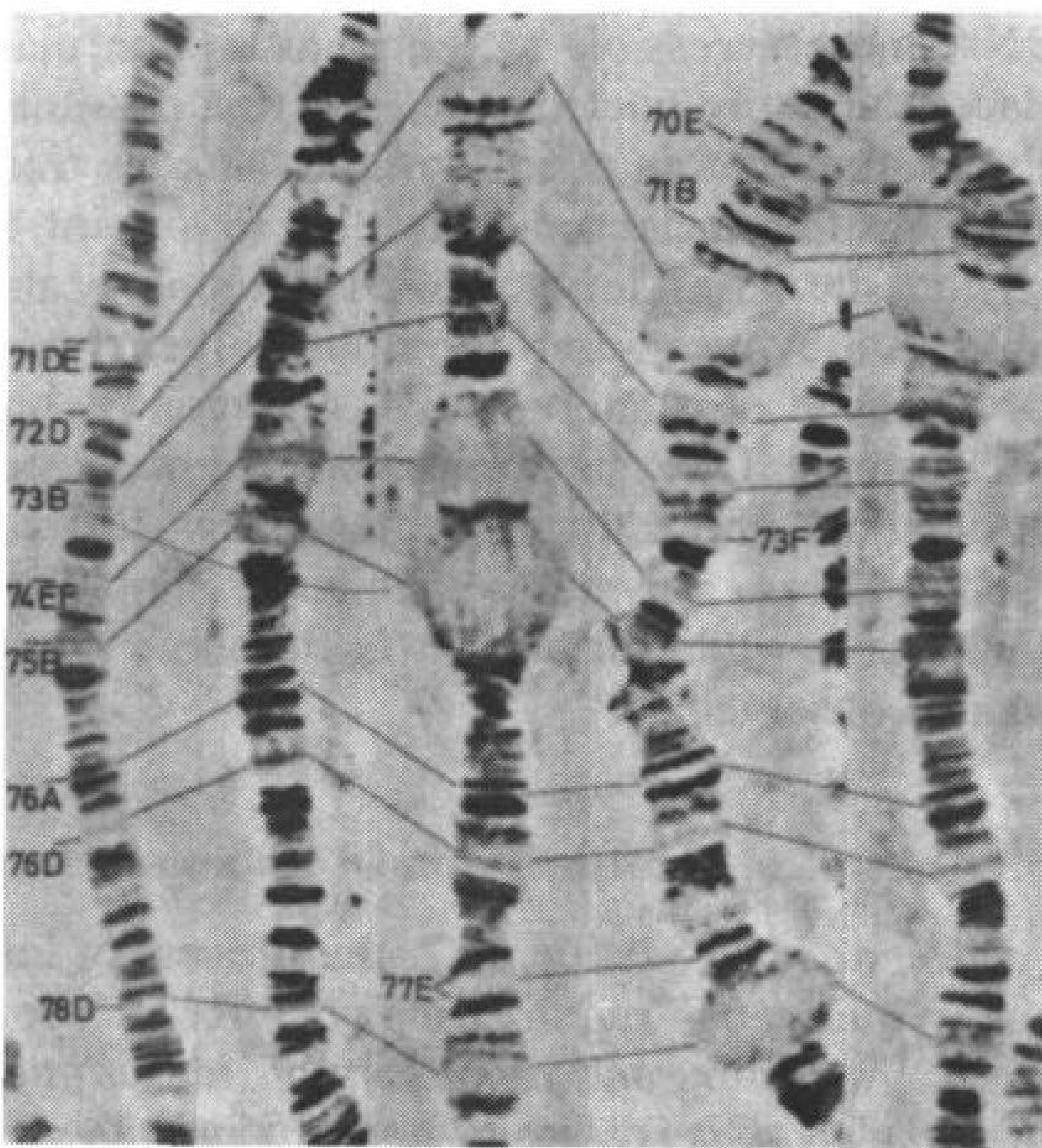


图 27-31 染色体胀泡的形成和聚集
这一系列的显微照片上可以看到经过 22h 幼虫发育后, *D. Metanogaster* 多线染色体上的胀泡(线条所示)。
(引自 Michael Ashburner, Cambridge University, UK)

性浓缩(图 27-30)。由于 DNA 进行多次复制,形成的子链彼此相连并排列整齐,从而形成多线染色体。这种染色体的亮带对应特定的基因;当进行转录时,这些条带更加解聚形成**染色体胀泡**(chromosome puff)(图 27-31)。在果蝇中,这种肿块可以重复的形成和复原而作为幼虫发育过程的一部分,另外,这一过程还对如急速或热等生理刺激产生响应。

912

组蛋白乙酰化影响核小体的结构

既然核小体紧密稳定地结合 DNA,那么 RNA 聚合酶及其结合的转录因子是如何接触到基因的启动子启动转录的呢?一个可能的答案是*组蛋白受调控的乙酰化和去乙酰化改变染色质的结构*。组蛋白 H3 和 H4 靠近 N 末端的赖氨酸残基上的 ε-氨基被细胞质**组蛋白乙酰转移酶**(histone acetylase)乙酰化,这种修饰是后续的核小体组蛋白八聚中心形成所必需的(节 23-5B)。另外,一系列核内组蛋白乙酰转移酶可以修饰所有四核心组蛋白上特定的赖氨酸残基。

如节 23-5C 所述,乙酰化使得从核小体内部伸出的赖氨酸残基不能带上正电荷(图 23-44a),从而减弱了它们对邻近核小体的亲和力,而且也可能减弱了对带负电的 DNA 的亲和力。这种核小体/染色质结构的破坏被认为是可以用来"打开"核小体进行转录。核内组蛋白和乙酰转移酶以及转录因子相关性的发现证明了组蛋白乙酰化和转录能力之间的联系。事实上,TFIID (25-2C)中 TAF 组分之一就是组蛋白乙酰化酶。移除乙酰基团的**去乙酰化酶**(histone deacetylase)家族显然是用来逆转组蛋白乙酰化的转录活化作用。组蛋白去乙酰化引起的"基因沉默"可以通过限制经转录因子作用的染色质的数量来增加作用于其他需转录基因的 RNA 聚合酶。在哺乳动物中,转录"沉默"的 DNA 比转录活泼的 DNA 有更高的甲基化程度。

虽然不同种类的修饰位点很不相同,但所有的真核生物都有组蛋白乙酰化和去乙酰化过程。修饰不同的组蛋白赖氨酸残基需要不同的乙酰转移酶;这可能影响到是哪种转录因子作用于那个位点上。还有一种情况是,一种转录因子的存在决定乙酰化打开核小体进行转录的程度。

913

组蛋白乙酰化究竟是仅仅使 DNA 更易被转录机器接近还是完全地移去核小体,这一点并不清楚。从模型系统中可以看出,最大的可能是,活泼转录的 RNA 聚合酶仅仅在初始位点上游 40~95bp 处驱逐开核小体。考虑到 DNA 的拓扑性质,这种可能性的推测却又显得似是而非。转录在行进过程中使在它前面的 DNA 产生正超螺旋而使后面的 DNA 产生负超螺旋(图 25-7)。而核小体结合的 DNA 围绕着它的组蛋白中心形成右手螺旋,是负超螺旋的。从而,前进的 RNA 聚合酶分子应该使它前方的核小体变得不稳定而同时促进核小体在它前进过的轨迹上累积,这一点正好已经被实验观察到。

B. 真核细胞的转录调控

如节 25-2 所述，真核基因转录的起始需要很多不同的蛋白和 DNA 上结合位点的参与。转录的活化因子和阻遏物有可能结合在启动子位点一定距离外的**增强子**(enhancer)和**沉默子**(silencer)上。例如，William Rutter 在胰岛素或胰凝乳蛋白酶基因的 5′端序列上连接表达**氯霉素乙酰转移酶**(chloramphenicol acetyltransferase, CAT)的序列，CAT 是一种在真核细胞中不存在的易检测到的酶。只有当被引入合成胰岛素的培养细胞中，含有胰岛素基因重组子的质粒才能表达 CAT 基因。同样，只有在合成胰凝乳蛋白酶的细胞中，胰凝乳蛋白酶重组子才具有活性。剪切胰岛素控制序列的实验表明这种增强子位于 103 和 333 位点之间，且仅仅存在于胰岛素合成的细胞中，它能引发 CAT 基因的转录，而这一过程与 CAT 基因相对于启动子的方向和位置无关。

913

增强子和沉默子被 TAF(节 25-2C)这类蛋白识别，除了所有基因转录所必需的通用转录因子之外，特定基因的转录必须有它们的作用。这些"上游转录因子"是如何引发或阻止转录的呢？显然，当这些蛋白结合到目标 DNA 位点时，它们就会活化或抑制转录的起始。这些蛋白协同地结合在一起或与 RNA 聚合酶结合，这种协同方式类似于 λ 阻遏物四聚体和 RNA 聚合酶结合到 λ 噬菌体 o_R 操纵基因的方式(图 27-27c)。分子克隆实验表明很多增强子是由这样的模块组成的，它们的删除会降低但是不能完全消除增强子的活性。这种复杂的设置使得转录调控系统可以对不同的刺激作出分级的反应。

转录因子自身含有 DNA 结合的结构域和活化转录机器的结构域。通过遗传工程杂交得到的具有一种转录因子 DNA 结合活性和另一种转录因子转录活化活性的蛋白具有和第一种转录因子同样的活性。实际上，活化结构域在 DNA 结合结构域的 N 端和 C 端并没有多大的不同。这种结合的空间排列自由对增强子 DNA 序列也适用：*转录因子对于增强子相对于起始位点的方位很不敏感。*

前面的观测假设了这样一个转录活化模型。其中，转录因子和增强子元件、起始前复合物[PIC：通用转录因子(GTF)与 TATA 框结合，促进 RNA 聚合酶与转录起始位点的结合，提供基本水平上的转录；图 25-14]相互作用导致了 DNA 的开环(图 27-32)。指定基因的转录速度随着上游转录因子数目的增加而增加，因为多位点的结合提高了富集 PIC 和 RNA 聚合酶的能力，增加了顺利完成转录起始的机会。

914

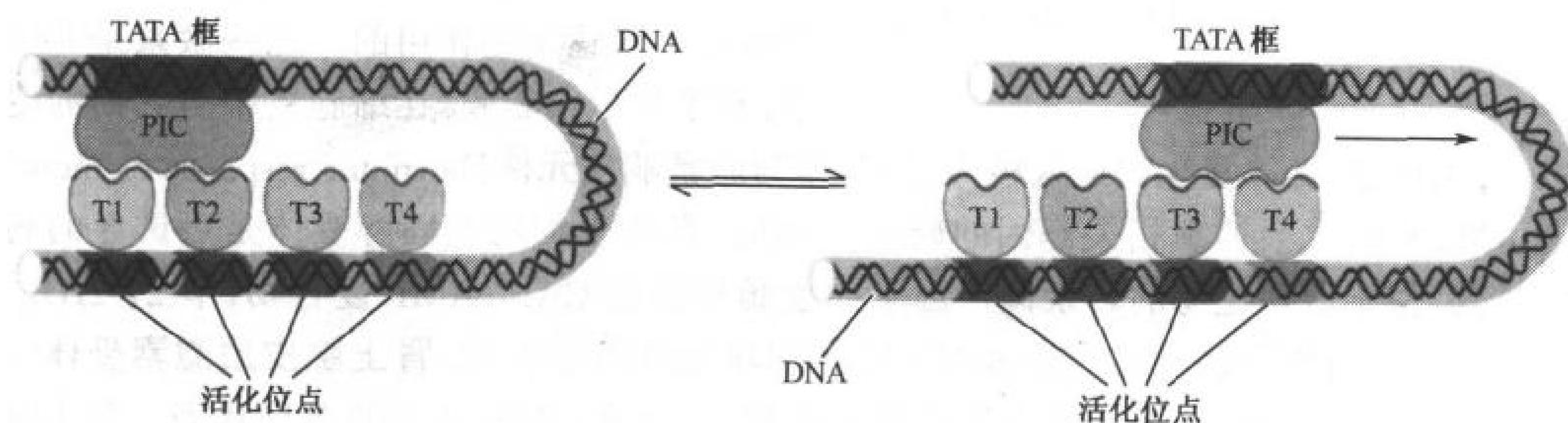


图 27-32　转录因子作用模型

这里，有 4 个转录因子 T_1、T_2、T_3 和 T_4，结合在它们的靶 DNA 序列上，同时，通过与结合在 TATA 框上的起始前复合物 PIC(见节 25-2C)间的相对非特异性的作用(红色)形成两组。转录因子和 PIC 之间的结合是相对较弱的，但可以推测不断的解离和再结合使得 RNA 聚合酶可以接触到 PIC 开始转录。[引自 Ptashne, M., Nature 335, 687(1988)]

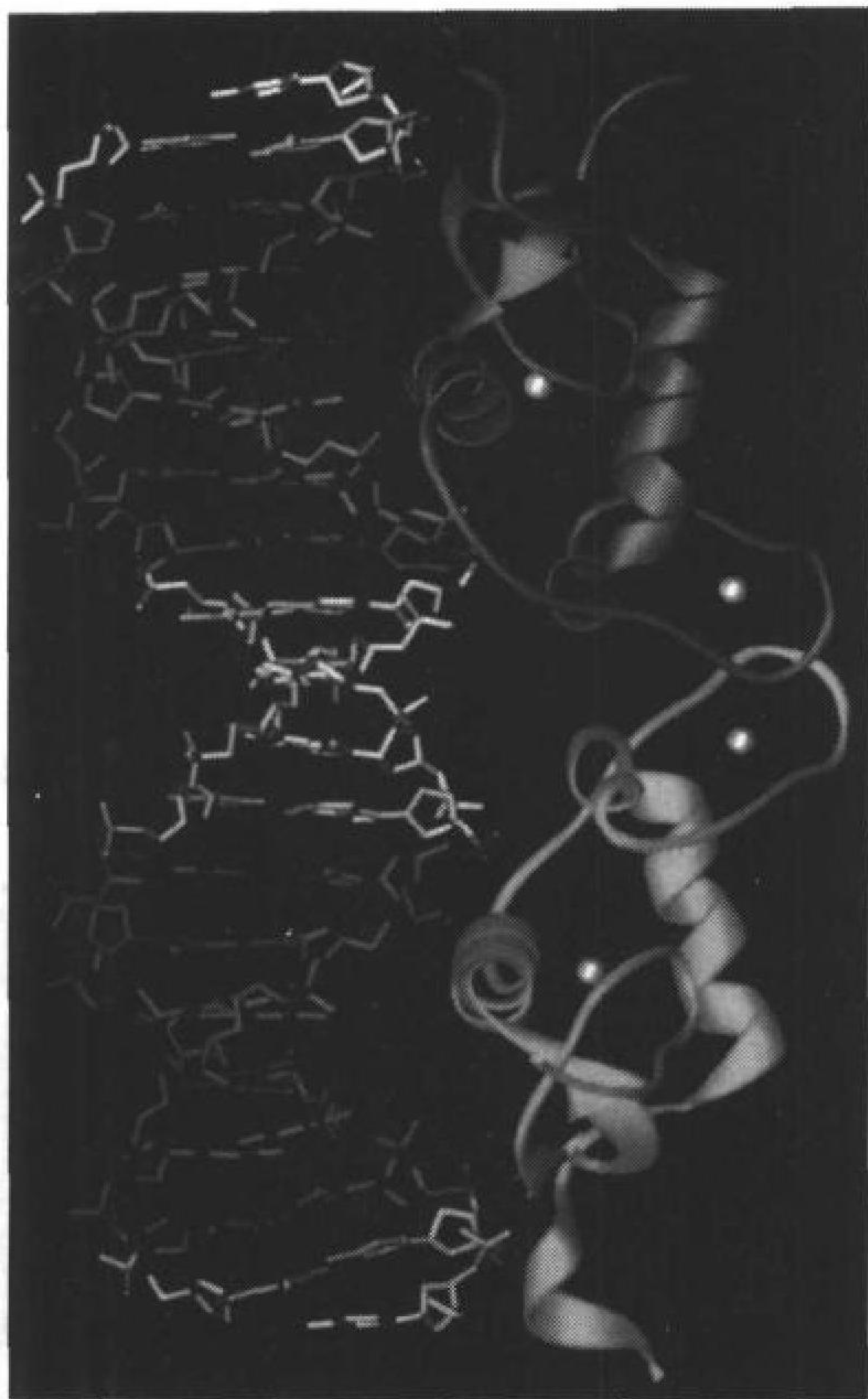


图 27-33 二聚肾上腺皮质激素受体 DNA 结合区域与 DNA 相结合复合物的 X 射线结构图

在 18bpDNA 的每个 5′端都有一个单核苷悬垂，并且含有两个对称的被 4bp 间隔（青色）分开的 6bp 的肾上腺皮质激素响应元件半位点（紫色）。蛋白质亚基由绿色和金色的带状表示，Zn^{2+} 离子由银色圆球表示。注意肾上腺皮质激素受体的两个 N 末端螺旋是如何以与原核生物 HTH 区域的识别螺旋类似的方式进入大沟。（引自 Paul Sigler, Yale University）

细胞外信号对基因转录的影响

不同类型的细胞表达细胞特异性的蛋白是它们自身程序化发育的一部分，同时也对细胞外信号产生反馈。在节 21-3C 中，我们看到配体结合在细胞表面受体上可以引发激酶级联导致核内转录因子的活化。至少还存在另外两种信号传导途径将细胞外信号传给转录机器。

配体结合不同的细胞表面受体使**信号传导蛋白和转录活化因子**（signal transducer and activator of transcription, STAT）这些细胞质蛋白活化，产生这种过程的生物体是多种多样的，下至黏液菌上至哺乳动物。STAT 蛋白含有 DNA 结合结构域：SH2 和 SH3 结构域。我们已知这两个结构域是参与酪氨酸激酶信号传导途径共有的蛋白元件（节 21-3C）。配体活化酪氨酸激酶将单个 STAT 的酪氨酸残基磷酸化从而活化 STAT 蛋白。磷酸化的 STAT 通过 SH2 磷酸化酪氨酸的相互作用而二聚化，进入核内，结合 DNA 引发特定基因的转录。例如，**催乳素**（prolactin）可以引发乳腺细胞中 **STAT5A** 结合 **β-酪蛋白**（β-casein）基因的启动子（β-酪蛋白是乳汁的主要蛋白成分）。缺少 STAT5A 的基因缺陷小鼠（节 3-5D 和节 13-4B）不能分泌乳汁。结合在 DNA 上的 STAT 与其他的转录活化因子相互作用，通过与其他转录活化途径的协同作用增加基因调控表达的可能性。STAT 诱导的转录持续时间依赖于这个蛋白去磷酸化的速度。

介导很多种生理过程的类固醇激素也是通过改变基因表达来起作用的。这些激素是非极性分子，易于穿过细胞膜，在细胞质中与它们的受体结合。然后，类固醇-受体复合物进入核内，结合作为**激素响应元件**（hormone response element）的增强子来引发，有时也会抑制相关基因的转录。亦即，真核生物的类固醇受体是可诱导的转录因子，其功能类似于原核生物的转录调控因子如大肠杆菌的 CAP-cAMP 复合物（节 27-2B）。有一类大家族的蛋白有相同的配体结合、DNA 结合和转录调控结构域，**肾上腺皮质激素受体**（glucocorticoid receptor, 一种影响碳水化合物代谢的类固醇，节 9-1E）是其中的典型代表。肾上腺皮质激素受体的 DNA 结合结构域包含两套结合有一个 Zn^{2+} 的 4 个半胱氨酸残基。锌指区域结合到 DNA 的 X-射线衍射结构显示受体形成同型二聚体，每个结构域都结合激素响应元件相互对称的一半（图 27-33）。

细胞周期素依赖的激酶调控细胞生长

细胞周期循环(cell cycle)，这一真核细胞生命过程中的基础事件，可以被分为 4 个明显的阶段(图 27-34)：

1) 有丝分裂和细胞的分开发生在相对短的 **M 期**(M：有丝分裂)；
2) 接着是 **G_1 期**(间歇期)，这是细胞周期中时间最长的时期；
3) G_1 期后面是 **S 期**(合成期)，与原核细胞不同的是，*这是真核细胞中惟一进行 DNA 合成的阶段*。
4) 在相对较短的 **G_2 期**(第二间期)中，形成的四倍体细胞准备进行有丝分裂。然后再次进入 M 期，开始新一轮的细胞周期循环。

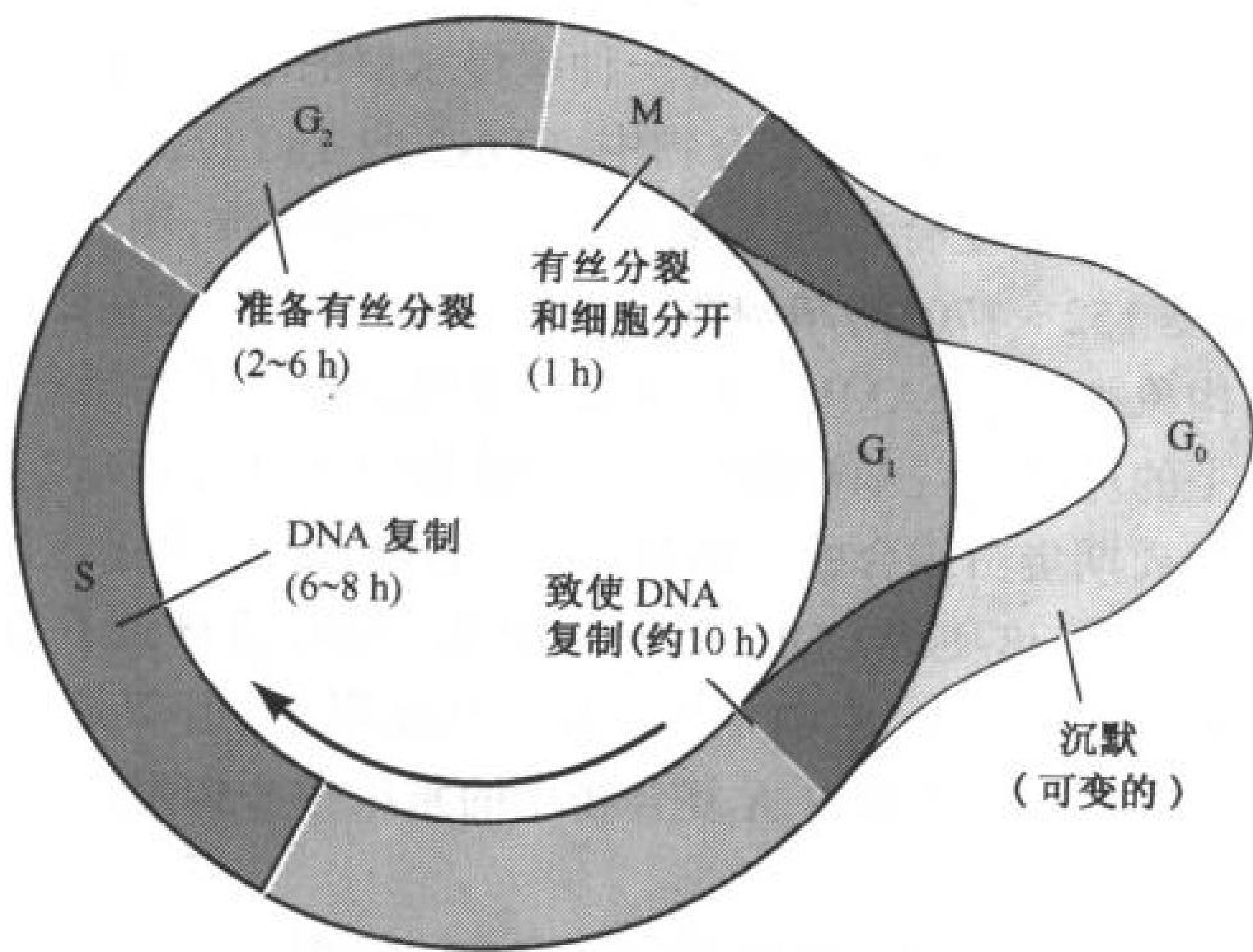


图 27-34　真核生物细胞周期

细胞除继续进行周期循环外可能进一个沉静期(G_0)。

典型的细胞周期循环大约是 16～24h。然而，多细胞生物不同类型的细胞其循环周期从最少 8 小时到 100 天不等。这种差别主要在于 G_1 期的长短。此外，很多末端细胞，例如神经元和肌肉细胞从不分裂；它们处于一个沉静的 **G_0 期**。

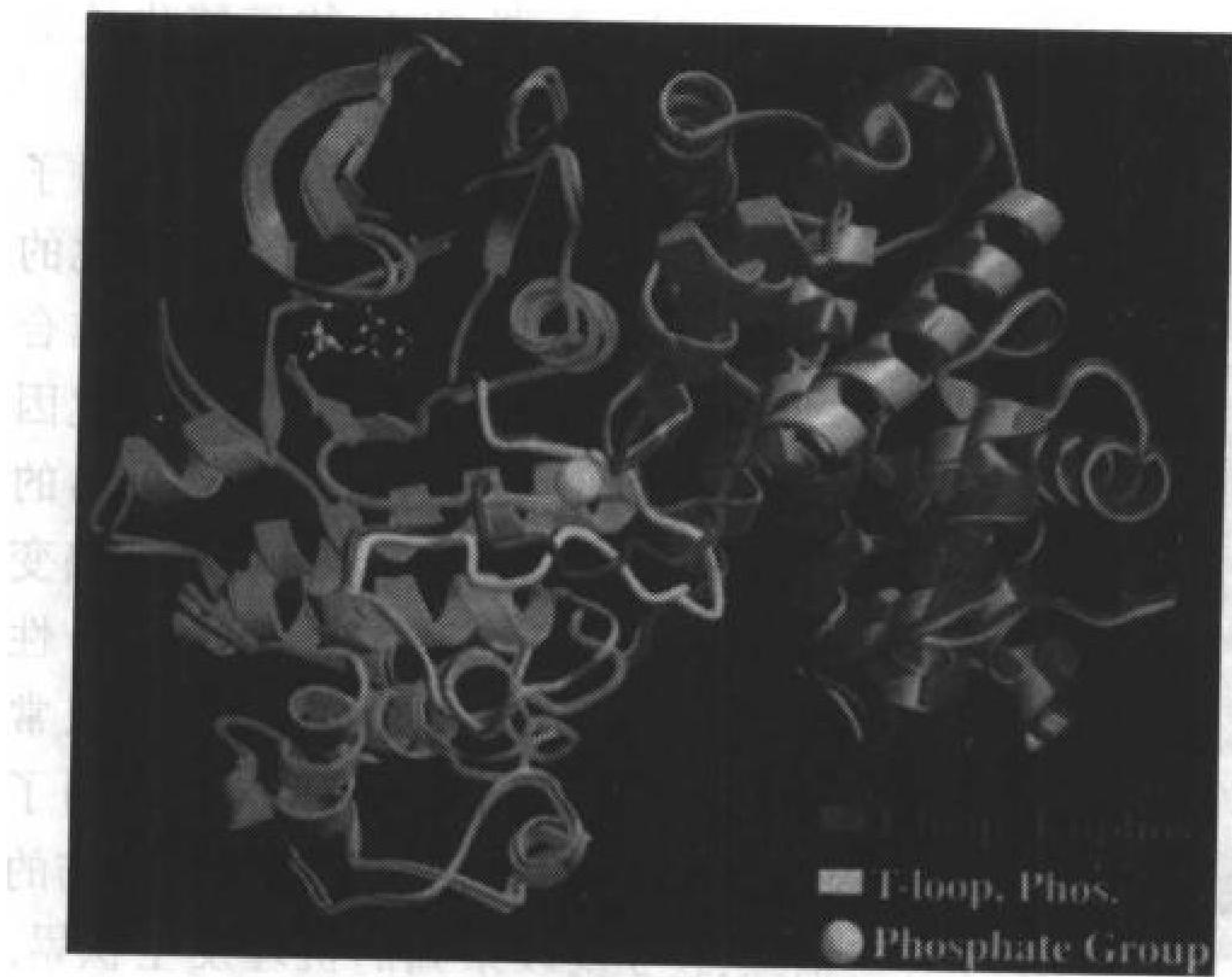


图 27-35　CDK2-CyclinA-ATPγS 复合物的 X 射线结构图，其中 CDK2 的 Thr 160 被磷酸化

细胞周期蛋白 A 是紫色的，CDK2 是青色的，而它的 T-loop 是黄色的，磷酸化基因是黄色圆球。这个结构图中叠加上了非磷酸化的复合，它被表示为灰色，而 T-loop 是红色部分。(引自 Nikola Parletich, Memorial Sloan-Ket-tering Cancer Center, New York)

细胞循环的行进依赖于在合适的时间里一定蛋白的表达。基础转录和活化转录都主要受到转录机器各种元件磷酸化的影响。对海洋无脊椎动物胚胎的研究提供了细胞循环周期调控的第一个线索，在细胞循环中，一组叫做细胞周期蛋白的蛋白稳定地累积，却在有丝分裂时突然消失。细胞周期蛋白在很多真核生物中都被发现，它和一个 34kDa 的蛋白结合形成活泼的 Ser/Thr 蛋白激酶，**细胞周期蛋白依赖的蛋白激酶**(CDK)，它的完整活性也可能需要磷酸化。

在人体中，细胞循环受几种 CDK 所控制。它们通过磷酸化核蛋白来进行调控，在这些核蛋白中有组蛋白 H1、

几种致癌基因蛋白(如下)、以及核分布和细胞骨架重新整理所需要的蛋白。这可能起始一系列在有丝分裂中达到高潮的细胞事件。

人类 CDK2 是这类 CDK 分子的一种,它的几种构象状态的 X 射线衍射结构已经被确定:①在与 ATP 形成的复合物中;②在与 ATP 以及**细胞周期蛋白 A** 的 C 端片段(残基类似物)形成的复合物中;③在与 ATPγS(一种缓慢水解的 ATP 类似物)以及细胞周期蛋白 A 的 C 端片段形成的复合物中,在这种 复合物中,CDK2 的 160 位上的苏氨酸残基被磷酸化(一种需要 CDK2-细胞周期蛋白 A 复合物完整催化活性的共价修饰;图 27-35)。在 CDK2-ATP 复合物中,称作 T 环(残基 152~170)的结构堵在催化裂缝的入口,而在细胞周期蛋白 A-CDK2-ATP 复合物中,T 环的构象类似于 cAMP 依赖的蛋白激酶的催化活性状态(cAPK;图 15-14)。然而,在 CDK2 的 160 位上的苏氨酸残基被磷酸化的细胞周期蛋白 A-CDK2-ATPγS 复合物的 X 射线衍射结构中,作为细胞周期蛋白结合的一部分,磷酸化的基团和带正电的催化裂缝能很好地结合,从而使 T 环移动了 7Å。这使得 CDK2 改造得更像 cAPK 而导致了另外的 CDK2-细胞周期蛋白 A 连接。虽然细胞周期蛋白 A 是 CDK2 的首要活化因子,但却是 CDK2 的 160 位苏氨酸的磷酸化基团起到 CDK2-细胞周期蛋白 A 复合物中的重组中心作用。

916

肿瘤阻遏物的缺少导致了一些癌症的发生

有一种确定的 CDK 的靶蛋白是**成视网膜细胞瘤蛋白**(retinoblastoma protein, Rb),它通过抑制转录因子 **E2F** 的功能来抑制细胞的生长。E2F 活化包括细胞周期蛋白在内的启动细胞增殖的基因。CDK 通过磷酸化 Rb 来逆转它的活性,从而改变细胞的生长。Rb 的缺失可以导致成视网膜细胞瘤(发育中的视网膜的一种癌变)和其他肿瘤的发病,因此它是一种**肿瘤阻遏物**(tumor repressor)。一些 CDK 的磷酸化还能直接抑制 E2F 的活性。

不同于 E2F 的是一种转录因子和肿瘤阻遏物 **p53**,通过 CDK 催化的磷酸化过程活化。磷酸化的 p53 结合到特定的基因起到强大的转录活化因子的作用。p53 基因的突变有 50%的可能性导致人类癌变。很多导致癌变的 p53 突变体缺失了序列特异性 DNA 结合的特点(图 27-36)。通常 p53 在鉴测基因组完整性上起到了"分子警察"的作用。当基因组损伤的时候,p53 就以未知的机理发生积累,从而活化 *Pic1* 基因的转录。*Pic1* 基因的 21kDa 的产物结合并抑制多种 CDK,导致细胞循环的暂止以保证 DNA 修复所需要的时间。如果 DNA 修复失败,p53 会引发细胞自杀,这个过程称作**细胞凋亡**(apoptosis),它阻

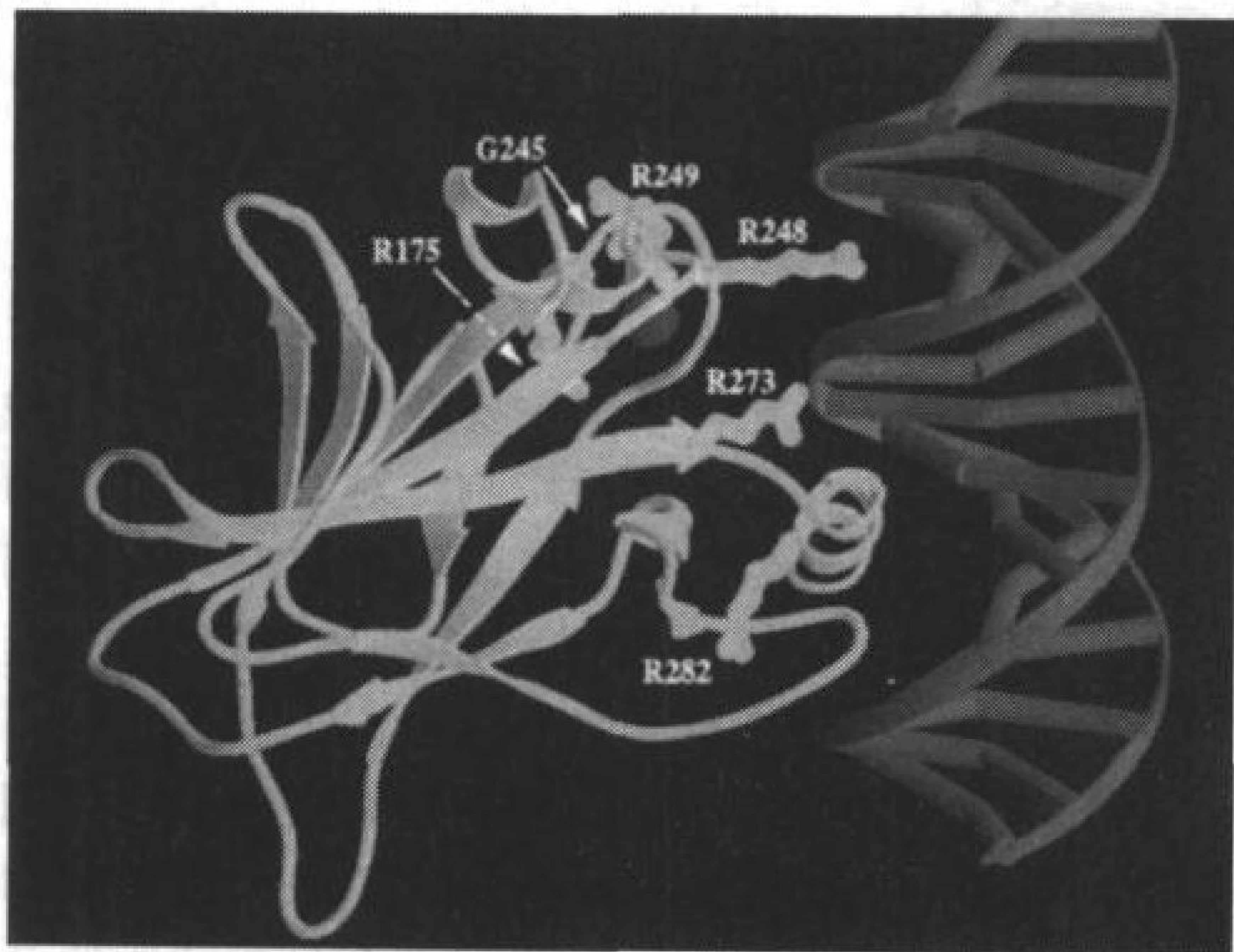


图 27-36 人类 P53 的 DNA 结合区与靶 DNA 形成的复合物的 X 射线结构图

蛋白用带状表示(青色),而 DNA 表示为梯状,它的碱基为圆筒状。癌细胞的 6 个最容易突变的侧链被表示为棒状(黄色),并用它们的单字母代码标出。(引自 Nikola Parletich, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, New York)

止了已经产生遗传损伤因而有癌变倾向的细胞增殖。而 p53 的失活则允许了这些癌变细胞的增殖。

C. 体细胞重组和抗体多样性

幼体细胞的遗传重组是多细胞生物繁殖的基本特征，在特定的其他类细胞中，也会出现遗传重组以产生新的遗传信息。例如，**体细胞重组**(somatic recombination)是表达免疫球蛋白(抗体)多样性所需要的。这就导致免疫系统具有识别几乎是无限的不同抗原的潜在能力。抗体多样性还会由于产生抗体的 B 细胞发育过程中突变的加速而增加(节 7-4D)。

κ 轻链基因是由多个基因片段所组成

两种免疫球蛋白轻链的一种，**κ 轻链**，是由四段外显子编码的(图 27-37)：

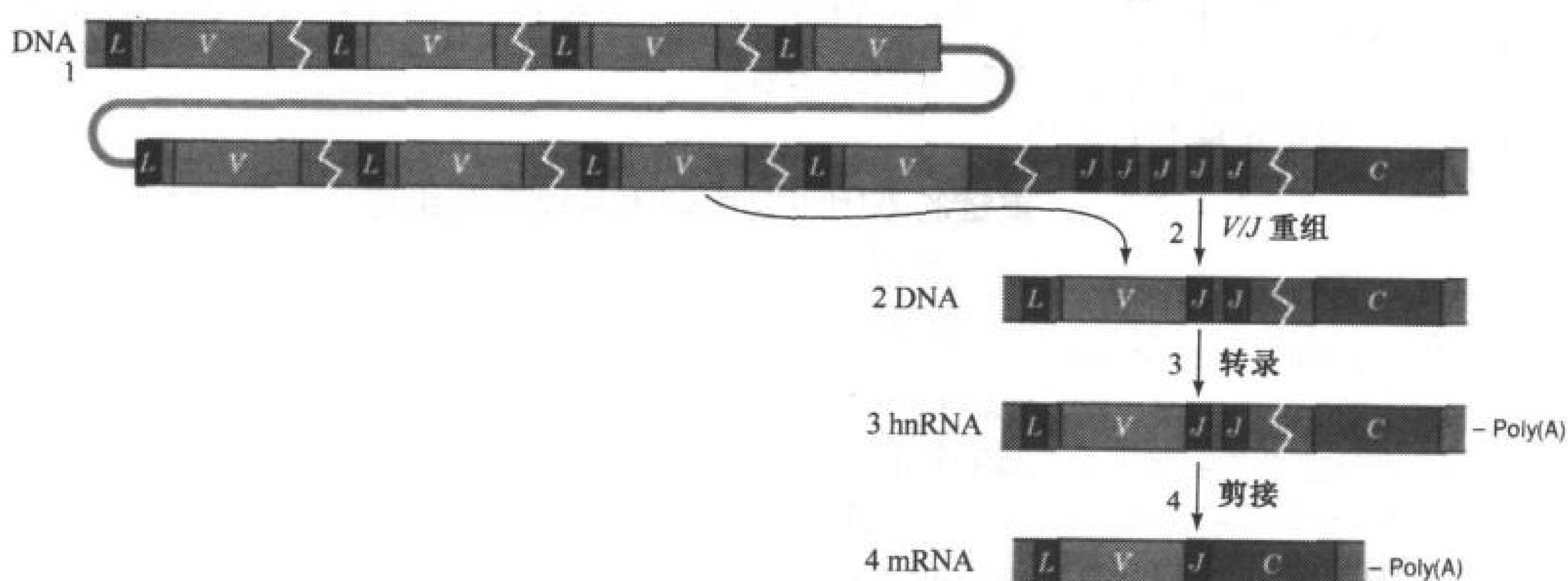


图 27-37 鼠的轻链家族的结构和重组

未成熟细胞的 κ 轻链基因家庭(1)含有约 150 个连续成对的 $L_κ$ 和 $V_κ$ 基因片段，后面跟有 5 个 $J_κ$ 片和一个 $C_κ$ 片段。在淋巴细胞分化时，一个 $L_κ$-$V_κ$ 单元通过体细胞重组与一个 $J_κ$ 单元结合(2)。在后代 B 细胞中，重组基因转录(3)并剪接(4)而连成前所选择的 $L_κ$、$V_κ$、$J_κ$ 外显子并连接上 $C_κ$ 外显子。

1) **前导片段(Leader segment, $L_κ$ 片段)**，它编码 17～20 个残基的疏水性信号多肽。这个多肽片段指引新合成的 k 轻链转移到内质网上然后被切除(节 10-2D)。 917

2) **$V_κ$ 片段**，它编码 κ 轻链 108 个残基可变区的前 95 个残基。

3) **连接片段(joining segment, $J_κ$ 片段)**，它编码可变区剩下的 13 个残基。

4) **$C_κ$ 片段**，它编码 κ 轻链的恒定区。

在胚胎组织中(不产生抗体)，这些外显子成串出现。κ 轻链基因家族由大约 150 个被内含子分割的 $L_κ$ 和 $V_κ$ 片段组成，$L_κ$-$V_κ$ 单元彼此之间有约 7 kb 的间隔。这种外显子的下游约 300 bp 处是 5 个 $J_κ$ 片段，然后是 2.4kb 的间隔，之后是一个单独的 $C_κ$ 片段。

κ 轻链 mRNA 的组合是一个复杂的过程，包括体细胞重组和选择性的基因剪切(节 27-3D)。这个过程的第一步发生在 B 细胞的祖先细胞，是染色体间的重组，将一个 $L_κ$-$V_κ$ 单元结合到 $J_κ$ 片段并删除插入的序列(图 27-37)。然后，在后代细胞中，完整的修饰基因被转录，并选择性地剪切以将 $L_κ$-$V_κ$-$J_κ$ 单元连接到 $C_κ$ 片段。在这一步中，$L_κ$ 和 $V_κ$ 片段还一起被剪切下来，产生编码 κ 轻链基因 4 个组分之一的 mRNA。

94 95 96 97
Val Gln
V_κ G T T C A T C T T C G A
J_κ A T G G C A A G C T T G
Ser Leu
Val His
V_κ G T T C A T C T T C G A
J_κ A T G G C A A G C T T G
Ser Leu
Val His
V_κ G T T C A T C T T C G A
J_κ A T G G C A A G C T T G
Arg Leu
Val His
V_κ G T T C A T C T T C G A
J_κ A T G G C A A G C T T G
Leu Leu

图 27-38 V_κ/J_κ 连接的多样性

V_κ 和 J_κ 序列体细胞重组时在交叉点上会有几个核苷酸的变数，从而增加了活性 κ 基因的核苷酸序列（褐色带部分）的变化。例如，如图所示，在 κ 轻链的第三超变区的第 96 位氨基酸可以是 Ser、Arg 或 Leu。

918

重组灵活性影响抗体的多样性

将 150 个 V_κ 片段之一和 5 个 J_κ 片段之一相连，只能产生 $150\times5=750$ 种 κ 轻链，这远比观察到的数量要少。然而，对于包括相同的 V_κ 和 J_κ 片段等的多个连接研究表明，*V/J 重组的位点并不是事先确定的；这两个基因片段可以在不同的交错位点相连*（图 27-38）。这样，V/J 连接点附近形成何种密码子编码氨基酸取决于幼体 V_κ 片段提供哪部分序列和幼体 J_κ 片段提供哪部分序列。假定这种重组灵活性可以 10 倍的增加 κ 轻链多样性，那么就可以预计可能的不同 κ 轻链的数目增加到 $150\times5\times10=7500$。

免疫球蛋白轻链的另一种，**λ 轻链**，类似地由含有 L_λ、V_λ、J_λ 和 C_λ 片段的基因家族编码，这些片段的重组同样可以产生多种可能的多肽。

重链的基因也是由基因片段系列组成

重链基因基本上和轻链基因的组成方式一样，只不过在 V_H 和 J_H 片段之间有一段约 13bp 的**多样性片段**（diversity segment）（***D* 片段**）。人类的重链基因家族的串联结构由大约 250 个不同的 L_H-V_H 单元、约 10 个 D 片段、6 个 J_H 片段和 8 个 C_H 片段组成（图 27-39）。幼体 V_H、D 和 J_H 片段以特殊的顺序相连（D 先连接上 J_H 而后 V_H 连接到 DJ_H），而且连接位点具有如同轻链的 V/J 位点一样的重组多样性。

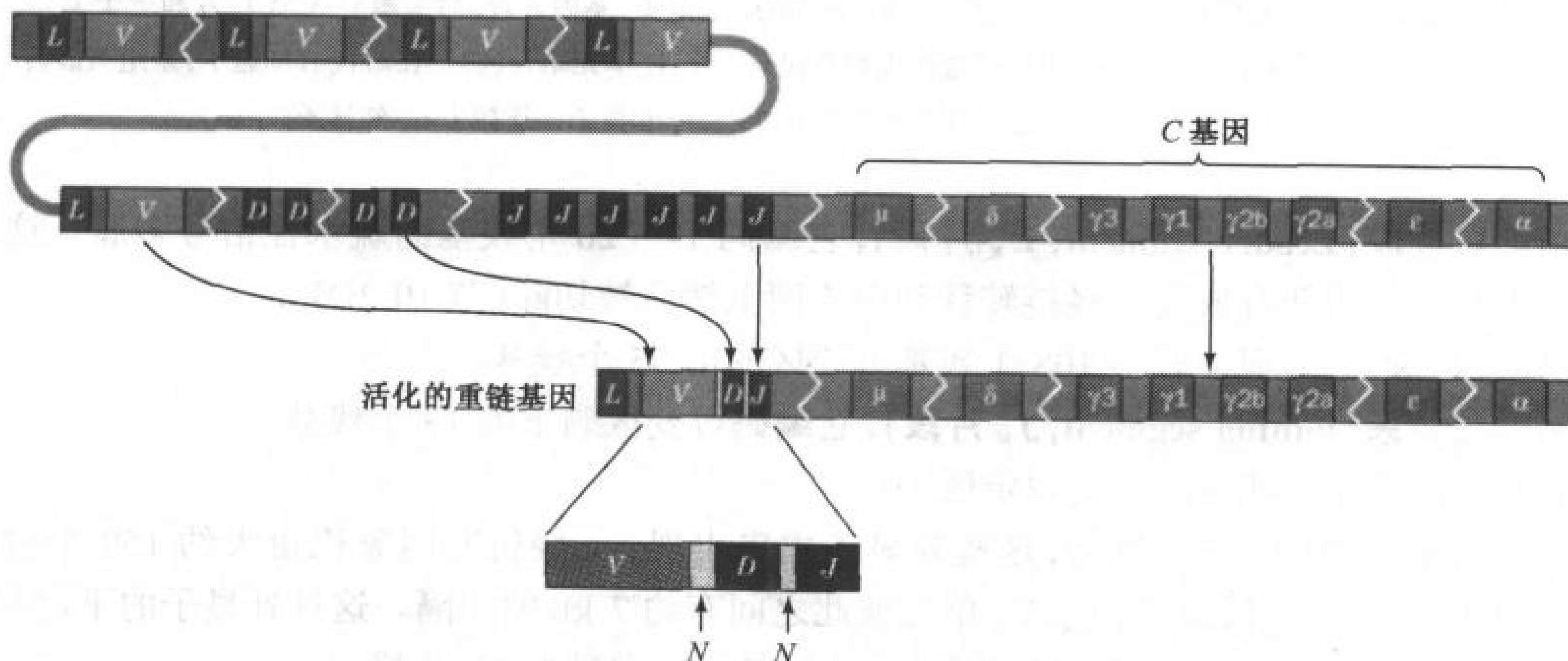


图 27-39 人类重链基因家庭的结构和重组

这一基因家族由约 250 个成对的 L_H 和 V_H 基因片段组成，后面是约 10 个 D 片段，6 个 J_H 片段和 8 个 C_H 片段（每一个对应重链的不同类成亚类，表 7-2）。在淋巴细胞分化时，一个 L_H-V_H 单元接合上 D 片段和一个 J_H 片段。这一过程中，D 片段由于无规序列（称作 N 区域）的轻微延伸而侧面相连。在 B 细胞和它的子代中，转录和剪接成 L_H-V_H-N-D-N-J_H 单元与 8 个 C_H 基因片段中的一个相连。

V、D 和 J 基因片段两边高度保守的序列可以形成作为重组信号的茎-环二级结构(图 27-40)。这些位点在结构上的类似和功能上的可交换性表明所有 $V(D)J$ 结合反应都是由一种进化保守的 **$V(D)J$ 重组酶**[V(D)J recombinase]系统催化的。事实上,David Baltimore 发现了两种蛋白质,**RAG1** 和 **RAG2**,它们识别剪切位点并参与双链 DNA 的剪切和后续的连接过程。

假设重组的灵活性可以 100 倍地增加重链多样性,体细胞重组可以产生 $250 \times 10 \times 6 \times 100 = 1.5 \times 10^6$ 种不同的重链。再加上 κ 轻链的多样性(忽略 λ 轻链的多样性),约 400 个基因片段进行的体细胞重组可以产生 $7500 \times 1.5 \times 10^6 = 110$ 亿种不同类型的免疫球蛋白。

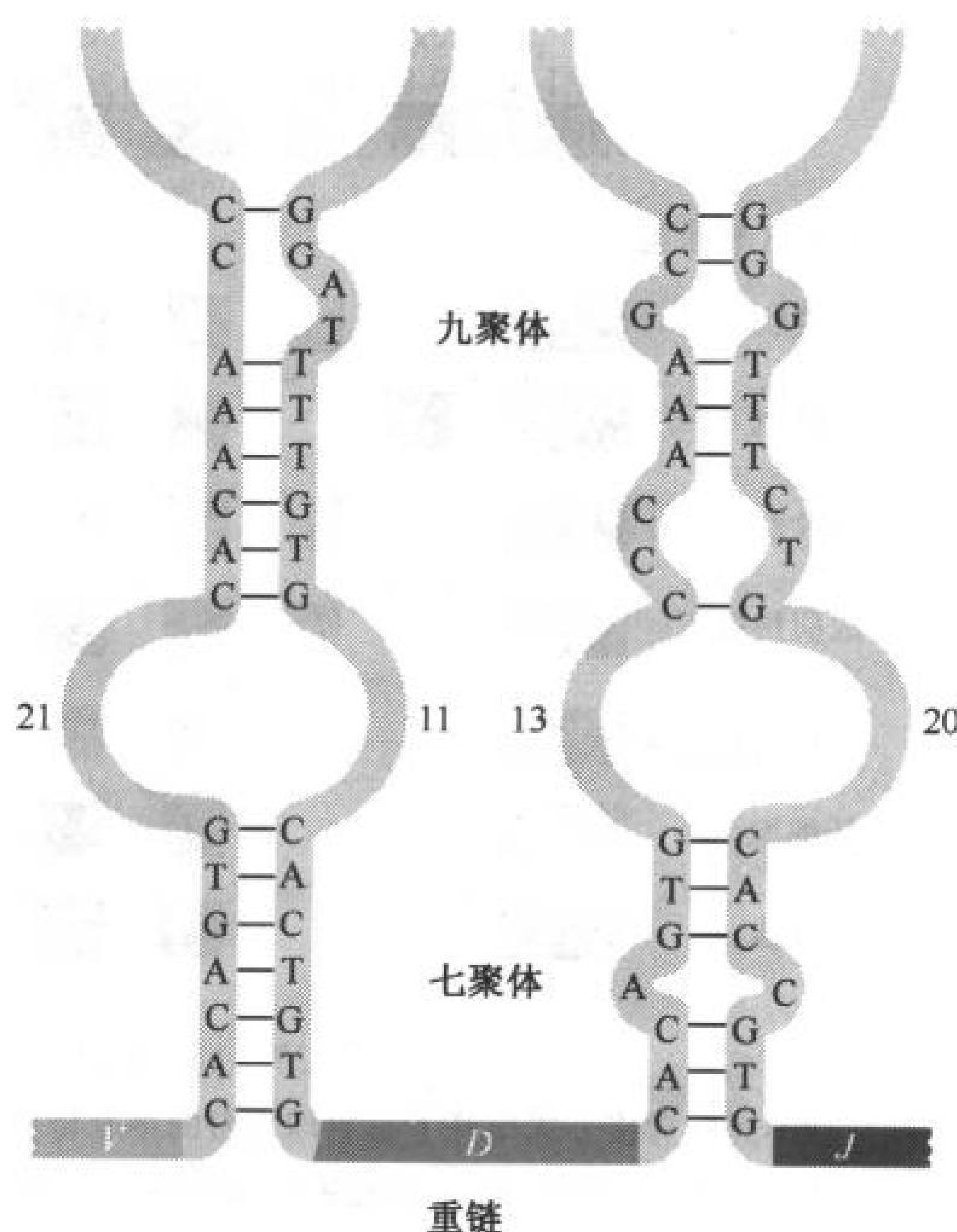


图 27-40 未成熟细胞的重链家族的干-环重组位点 这些结构引起 V_H 与 D 片段(左)之间和 D 与 J_H 片段(右)之间的体细胞重组。κ 轻链的 V/J 重组含有类似的七聚-九聚干-环结构。重组系统需要 20/21 和 11/13bp 的间隔而防止略过 D 片段直接将 V_H 和 J_H 片段相连

体细胞突变更加导致了抗体的多样性

尽管体细胞重组导致了很大的抗体多样性,免疫球蛋白还可以通过两种方式的**体细胞突变**(somatic mutation)产生更大的多样性:

1) V_H/D 和 D/J_H 结合过程中,在重组位点上可能会加入或移去一些核苷酸。加入的核苷酸形成所谓的 N **区域**(N region),产生达 30bp 的 NDN 单位,编码 10 个氨基酸残基的高度多变性的重链片段(图 27-39)。N 区域由**末端脱氧核苷酸转移酶**(terminal deoxynucleotidyl transferase)的作用而产生,这是一种 B 细胞祖先细胞中产生重链连接的模板非依赖型 DNA 聚合酶。在轻链连接已经形成的后代细胞中,有可能缺乏这种酶。

2) 比较氨基酸序列和对应的幼体核苷酸序列,重链和轻链的可变区有比预想的更高的多样性。事实上,这些区域以每代有 10^{-3}碱基变化的速度进行突变,这一突变速度比其他基因的自发突变速度要高一百万倍。B 细胞或它的祖先细胞显然含有介导这种免疫球蛋白基因片段进行**体细胞高突变**(somatic hypermutation)的酶。

这些体细胞突变使得不同抗体的可能数目比仅仅由体细胞重组造成的 110 亿个提高了很多数量级。由体细胞重组和体细胞突变引起的多样性使得一种生物体以一种达尔文竞争的方式来应付致病性微生物的快速多变。

D. 转录后和翻译调控

事实上,从转录到转录后修饰到最终由蛋白酶水解,蛋白质在每一个存在阶段都可能受到调控。绝大多数基因的表达可能通过不同的途径进行调控。在这一节里,我们将阐述一些这样的调控机理。

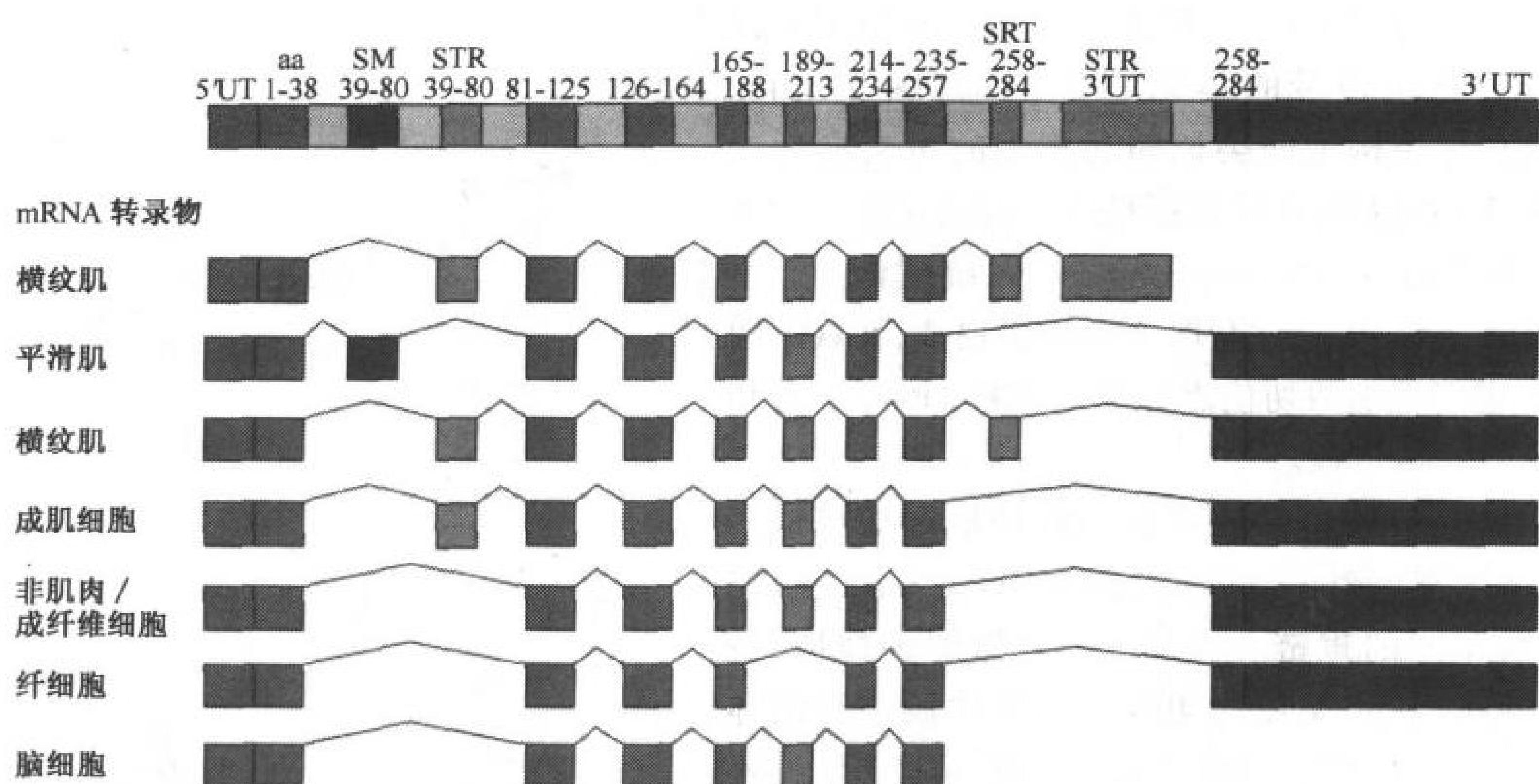


图 27-41　大鼠 α-肌球蛋白基因的可选择性剪接

7 种不同的剪接方式提高了 α-肌球蛋白的细胞特异性。细胞的弯曲线表示的是未被剪切出而形成成熟 mRNA 之前内含子所占据的位置。组织特异性的外显子用它们编码的氨基酸残基表示在一起;"固定的"外显子(所有组织中表达)是蓝色的,只在平滑肌(SM)中表达的是栗色的;只在横纹肌(STP)中表达的是紫罗兰色的;不定表达的是黄色的。注意平滑肌和横纹肌外显子编织的 39～80 氨基酸残基是相互排斥的,同样,有可选择的 3′端非翻译(UT)外显子。[引自 Breitbart, R. E., Andreadis, A., 和 Nadal-Ginard, B., Annu. Rer. Biochem. 56, 481(1987)]

选择性剪切可以从单一的基因产生多种蛋白质

很多细胞基因的表达被剪切位点的选择所调控。这样,含有多个外显子的基因可以转录不同的外显子,结果是一种细胞的外显子在另一种细胞中可能是内含子。例如,鼠的单个基因通过剪切位点的选择编码 7 种组织特异性的不同的肌肉蛋白 **α-原肌球蛋白**(α-tropomyosin)(图 27-41)。

920

选择性剪切排列有很多种潜在的形式,并不是每一种都能产生功能性的蛋白。例如,初级转录本移去内含子的失败就可能产生无功能 mRNA。一种剪切方式出现在一种组织而不出现在其他组织中就导致了基因产物的组织特异性合成。我们还观察到了由于外显子遗漏造成的无功能基因产物的产生。

mRNA 以不同的速度降解

从半衰期看,真核细胞中 mRNA 的稳定性其范围从几分钟到几小时或几天不等。mRNA 分子自身含有决定其衰减速度的成分。这些成分包括 polyA 尾结构、5′帽子结构以及在编码区内部的序列。

通过外切核酸酶的逐步作用产生的**去腺苷化**(deadenylation)是 mRNA 衰减的先决条件。当残余的 polyA 尾结构小于 10nt,不能再和 polyA 结合蛋白作用时(节 25-3A),mRNA 就被内切核酸酶或外切核酸酶迅速地降解。某些情况下,去腺苷化使 mRNA 成为**去帽酶**(decapping enzyme)的底物而移除 5′帽子,从而使 mRNA 易受 5′→3′外切核酸酶的降解。现在还不清楚分子 3′端发生的变化是如何影响到 5′端的去帽过程,但是 mRNA3′非翻译区域的二级结构可能参与

到核糖核酸酶的募集过程。

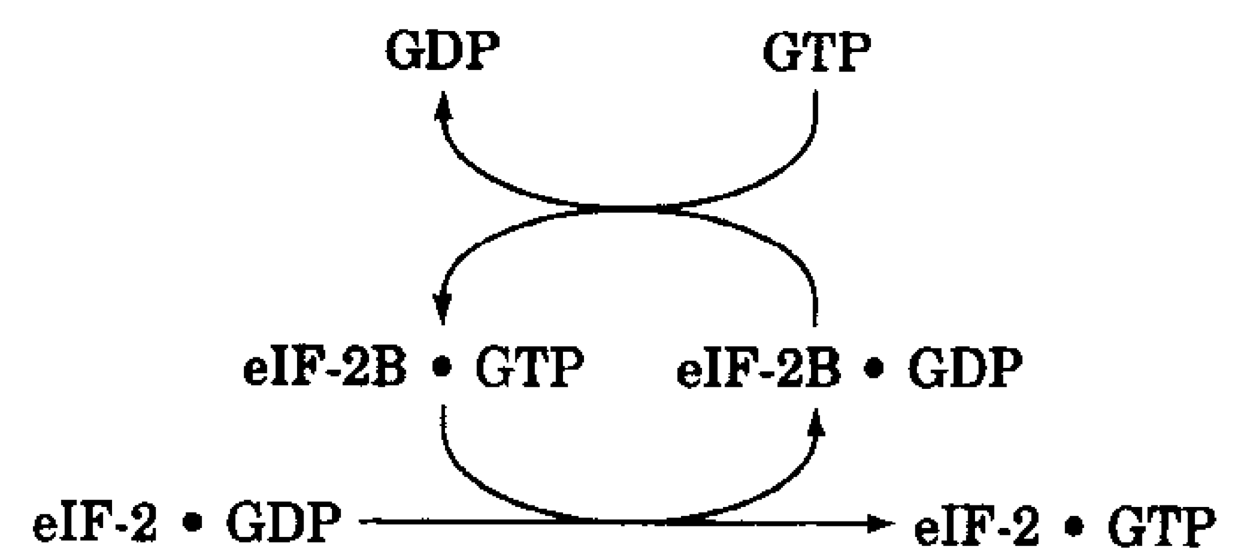
体外实验表明翻译过程可能会缩短一些 mRNA 的寿命，虽然这种现象产生的机理还不甚明了。一种可能是核糖体自身被用于降解 mRNA。 921

翻译调控

在某些细胞中，改变 mRNA 生成和降解的速度并不能提供必需的调控水平。例如，青蛙、昆虫、海胆的早期胚胎发育依赖于在卵母细胞中储藏的 mRNA 的快速翻译。mRNA 以与蛋白质结合的非活性形式储存，而一旦受精就可以进行翻译。这就保证了胚胎发育可以立即开始，而无需等待 mRNA 的合成。

网状细胞(不成熟的红细胞)中球蛋白的合成也是很快进行的，但是这一过程发生在亚铁血红素存在的情况下。这种球蛋白合成的抑制发生在翻译起始水平。亚铁血红素缺乏的时候，网状细胞中积累**亚铁血红素调控阻遏物**(heme-controled repressor, HCR)这种蛋白质，它磷酸化一个特定的丝氨酸残基，eIF-2(将 GTP 和 Met-$tRNA_i^{Met}$ 递送给核糖体的起始因子；节 26-4A)α 亚基上的 Ser 51。缺乏亚铁血红素时，通过一种事先存在的前阻遏物产生 HCR，这一过程还不能进行很好的描述。

磷酸化的 eIF-2 基本上和非磷酸化的 eIF-2 一样参与到翻译起始过程，但是它不能正常地重新产生。在起始过程完成时，未修饰的 eIF-2 通过另一种起始因子 **eIF-2B** 介导的反应将结合的 GDP 转化成 GTP(见右图)磷酸化的 eIF-2 比非磷酸化的 eIF-2 能形成更紧密的复合物。这遮盖了比 eIF-2 数量少得多的 eIF-2B(图 27-42)，防止了翻译需要的 eIF-2·GTP 的重新产生。磷酸化的 eIF-2 由 **eIF-2 磷酸酶** elF-2 phosphatas 催化再活化，这个过程并不受亚铁血红素的影响。 922



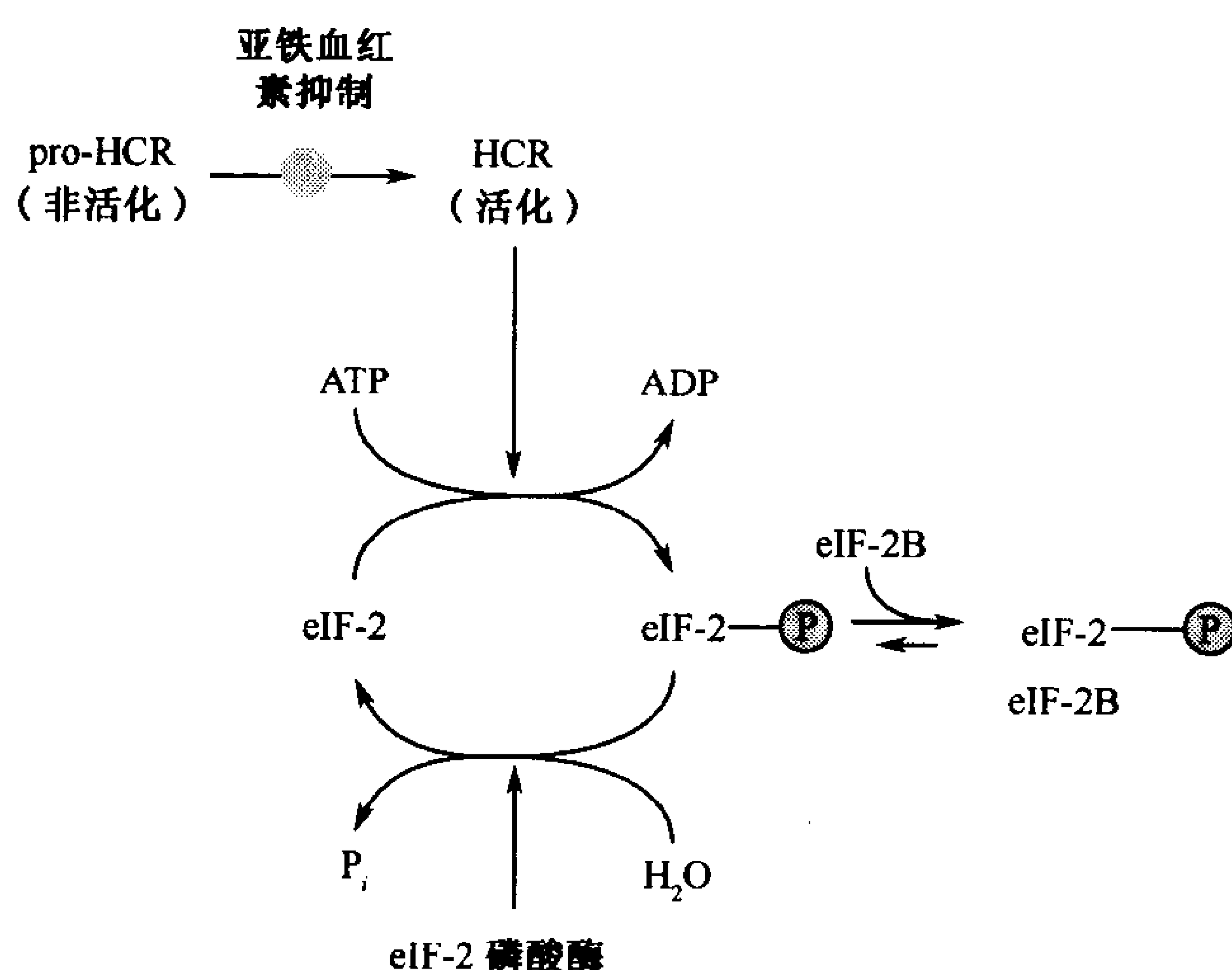


图 27-42　网状细胞亚铁血红素调控蛋白质合成模型

E. 发育的分子基础

在生物学中，最令人敬畏的过程也许就是受精卵生长发育成多种多样的多细胞生物。不需要外界的指令来指导这一过程的进行。*受精卵自身就含有形成复杂的多细胞生物，例如人类，所需要的全部信息。*我们所知道的很多关于细胞分化的分子基础是基于果蝇的研究而建立的。这一节我们从果蝇胚胎形成的大体过程开始讨论。

果蝇的发育

果蝇卵产下以后(在这之前的受精过程并不引发发育)几乎立即就开始发育(图 27-43a)，它开始一系列快速的、几乎同时进行的核分裂，每 6～10min 一次。但这仅仅是进行核分裂而没有新的细胞膜的形成；这些核共存于同一细胞质中形成所谓的**多核体**(syncytium)(图 27-43b)。在核分裂进行了 8 代之后，256 个核开始向卵的皮层(外层)移动，到了第 11 代核分裂时，这些核已经围绕富含卵黄的中心形成了一个单层(图 27-43c)(在第 9 代分裂之后，原胚细胞、极细胞就被放置到旁边了)。在这一阶段，由于 DNA 的复制，有丝分裂时间开始延长，核基因开始活泼的转录(新生的卵细胞有由被很多"滋养"细胞包围的发育的卵母细胞提供的大量的 mRNA 储备)。到第 14 代核分裂循环时，这大约持续 60min，卵的质膜内陷将 6000 个核中的每一个包围起来形成一个细胞单层，称为**囊胚层**(blastoderm)(图 27-43d)。发育 2.5h 后，转录活性达到最高值，有丝分裂的同步性丧失。

接下来的几个小时，胚将继续发育形成**原肠胚**(gastrulation)(细胞迁移形成的三层结构)并进入器官发生。果蝇和其他高等生物在这一过程的明显特征是胚胎分裂成对应成熟机体器官的系列节结构(图 27-43e)。果蝇胚胎有 3 个最终形成它的头部的头节[Md(下颌)、Mx(上颌)和 Lb(嘴唇)]，3 个胸节(T1～T3)和 8 个腹节(A1～A8)。随着发育的继续，几个腹节折叠包裹住胸节(图 27-43f)。在这一阶段，节更进一步分化成前部和后部隔室。起始发育后 1 天，胚胎变短并打开折叠形成幼虫(图 27-43g)。接下来的 5 天，幼虫进食、生长、蜕皮两次成蛹，变态形成成虫(图 27-43h)。在这个后期过程中，幼虫表皮几乎完全被长出的称作**成虫盘**(imaginal disk)的不分化幼虫表皮层所取代，它们早在胚盘阶段就已进入状态发育。这些保持着幼虫节分割的结构，继而形成腿、翅、触角、眼等器官。在大约开始发育后的 10 天，成虫形成，并大概在几小时之后，开始新的繁殖周期。

924

遗传介导的发育模式

胚胎模式形成的机理是什么呢？对于这一过程的理解主要来自于对一系列 3 种果蝇基因的特异突变的遗传性分析，这 3 种基因在发育的胚胎中确定细胞专门化区域。

1)**母体效应基因**(maternal-effect gene)，*它决定胚胎的极性*，亦即，胚胎的前后(头尾)轴和背腹(背和腹)轴。这些基因的突变会改变胚胎形成的体形，产生例如在相对的方向有两个头部或两个尾部的无法存活的胚胎。

2)**分节基因**(segmentation gene)，*它们确定胚胎体节的准确数目和极性。*分节基因可以被分为以下几类：

(a)**间隔基因**(gap gene)，发育的胚胎首先转录的基因。这样命名的原因是它们的突变会造成胚胎间隔的变化。例如，含有缺陷性 ***hunchback*(*hb*)**基因的胚胎缺少口器和胸腔

结构。

(b)**配对-界定基因**(pair-rule gene)决定将胚胎的宽的间隔区分化成多个小节。这样命名的原因是它们的突变会造成每一个二级节部分缺失。

(c)**节极性基因**(segment polarity gene)确定发育的节的极性。这样，***engrailed***(en)基因的同型突变会使得每一个节都缺少后隔室。

3)**同源异型选择基因**，确定节的同一性。它们的突变可以把身体的一部分转化成另一部分。例如，**触角-足**[*Antennapedia*(*Antp*, antenna-foot)]突变使一个触角变成了一条腿(图 27-44a)，而**双胸**[*bithorax*(*bx*)]、**触角-双胸**[*anteriorbithorax*(*abx*)]、**后双胸**[*postbithorax*(*pbx*)]突变均会使只在 T3 节中出现的平衡棒(一种缺陷的翅起着平衡器的作用)转变为只在 T2 节中出现的翅部分(图 27-44b)。

母体基因突变的特点表明母体基因确定**成形素**(morphogen)，它在卵的细胞质中就决定了胚胎将来的空间调整。事实上，Christiane Nüsslein-Volhard 的免疫荧光研究证明了 ***bicoid***(***bcd***)基因的产物形成一个向胚胎后部逐渐降低的浓度梯度(图 27-45a)，而缺乏 *bcd* 的母体产生的胚胎就没有这种梯度。*bcd* mRNA 由滋卵细胞产生，在卵子发生期分泌到卵母细胞的前部造成了这样的梯度。***nanos*** 基因 mRNA 也类似地沉积在卵的后部。*bcd* 和 *nanos* 基因的产物调控特定的间隔基因的表达。还有一些母体基因产生蛋白以限制局部化的 mRNA 沉积在它们应该所在的部位。这就解释了为什么由母体基因突变形成的早期胚胎可以通过注射早期野生型胚胎的胞浆或 mRNA 来进行营救。

间隔基因 *hunchback*(*hb*)在未受精的卵中是均一分布的(图 27-45a)。然而，**Bicoid 蛋白**活化胚胎 *hb* 基因的转录而 **Nanos 蛋白**阻止 *hb* mRNA 的翻译。这样，Hunchback 蛋白就形成了一个从前部到后部的下降的浓度梯度(图 27-45b)。足迹实验研究表明在 *hb* 基因启动子的上游，Bicoid 蛋白结合 5 个

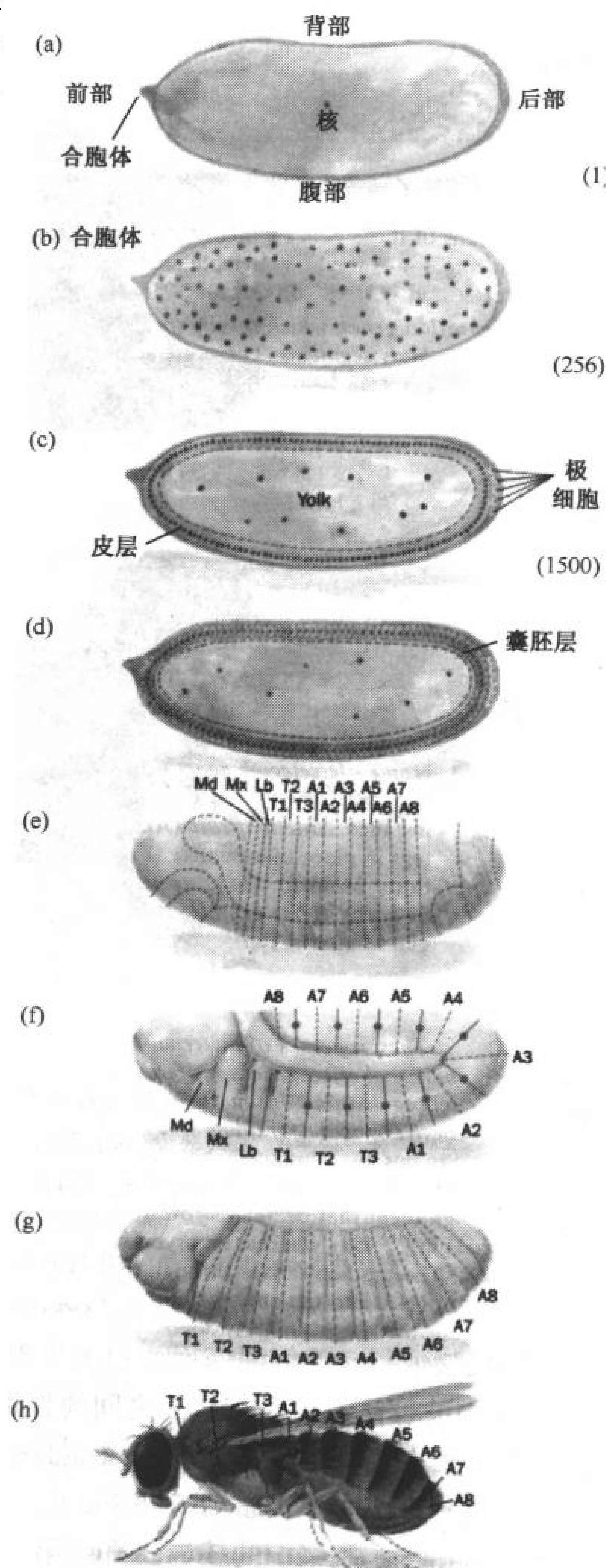
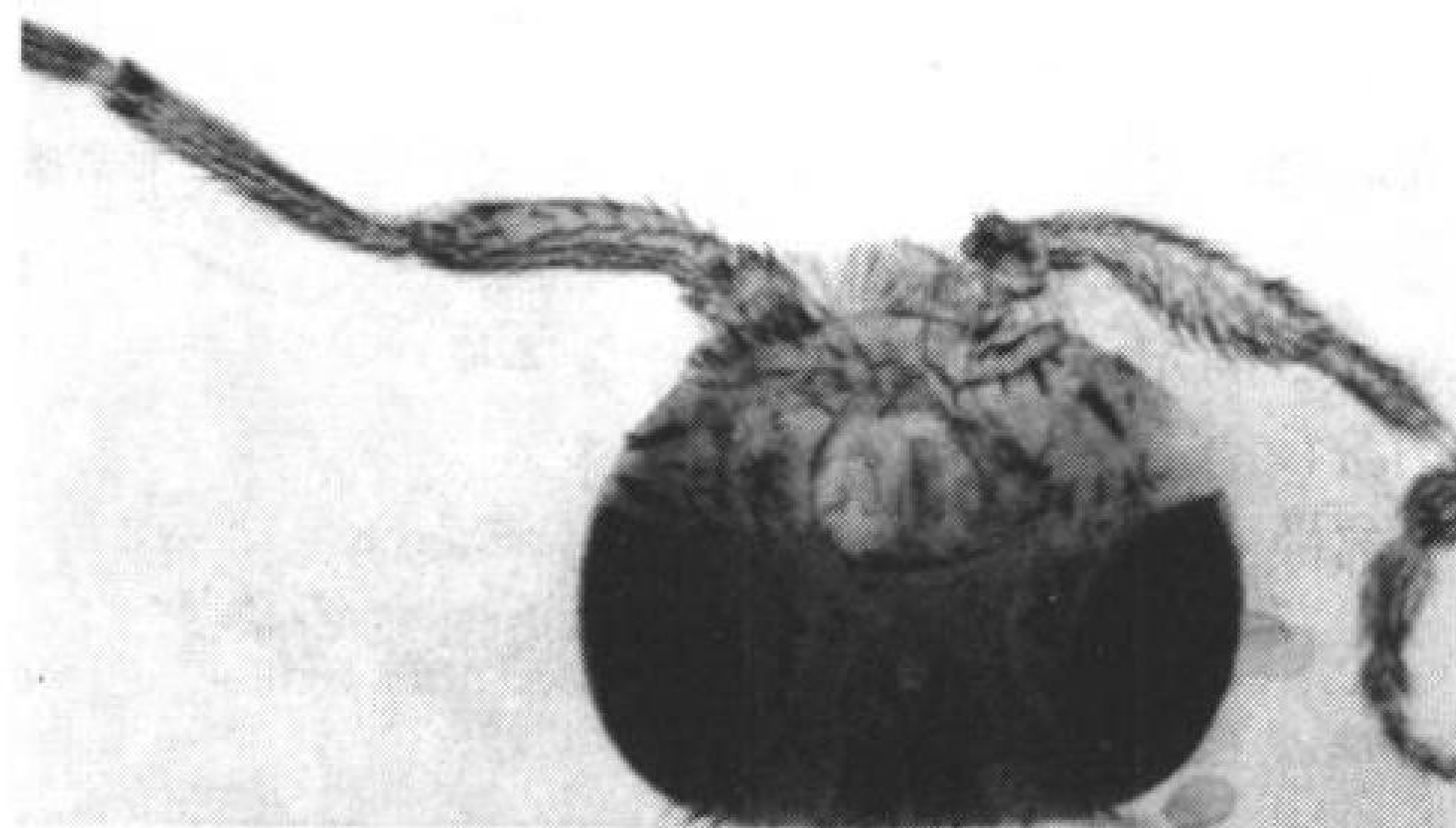


图 27-43 果蝇的发育

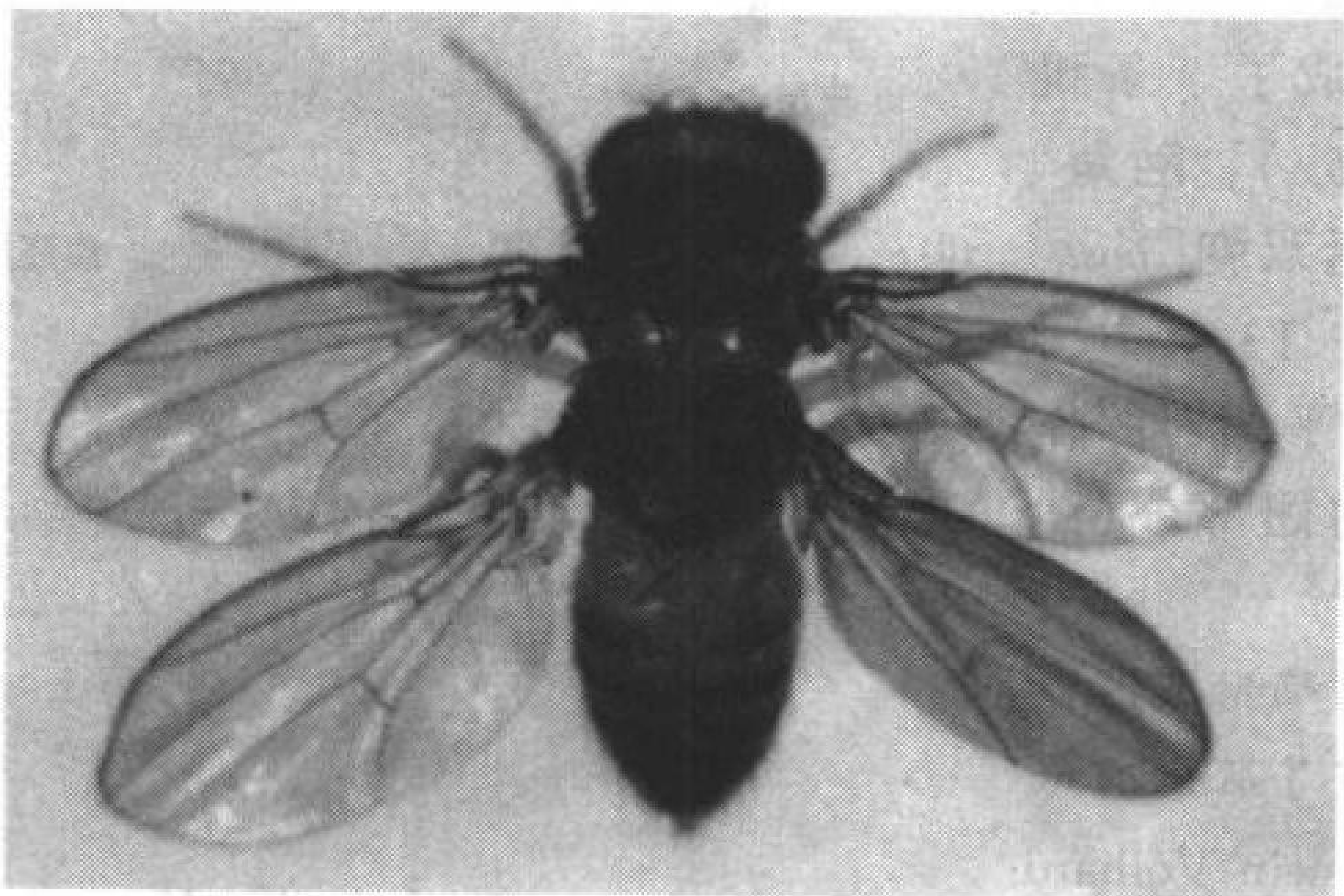
各个阶段在文中有述。注意胚胎细胞和所有孵化的幼虫是相同大小的，约 0.5mm 长。成年个体，当然要大的多。括号中的数字指的是早期阶段的细胞大致数目。

同源的序列(保守序列 TCTAATC-CC)。

Hunchback 蛋白调控几种其他间隔基因的表达(图 27-45c, d):高水平的 Hunchback 蛋白诱导 *giant* 的表达;当 Hunchback 蛋白开始减少时, ***Knüppel***(德语:cipple)表达;**knirps**(德语:pigmy)基因在 Hunchback 蛋白低水平时就可以表达;而 *giant* 在没有 Hunchback 蛋白的区域可以重新活化。这种基因表达的模式有另外的反应来稳定和维持。例如,**Krüppel 蛋白**结合在它所活化的 *hb* 基因启动子上,或结合在它所抑制的 *knirp* 基因的启动子上。相反的,**Knirps 蛋白**抑制 *Krüppel* 基因。这种相互抑制导致了不同的间隔区的明显界限。



(a)



(b)

图 27-44 果蝇的发育突变

(a)触角-足突变纯合子成虫的头部,缺少 *Antp* 基因产物使得本应发育成触角的成虫盘发育成本应只在 T2 节出现的足。(引自 Walter Gehring, University of Based, Switzer land)(b)四翅果蝇(正常两翅)可以由双胸复合物中的三类突变造成。这些突变使本应发育成 T3 节出现的平衡棒发育成 T2 节中出现的翅。(引自 Edword B. Lewis, Caltech)

配对-界定基因表达为早期胚胎前后部轴上的一系列 7 个条带,每一个只有几个核的宽度(图 27-46)。间隔基因产物直接调控 3 种**初级配对-界定基因**(primary pair-rule gene)的表达: ***hairy***、***even-skipped***(***eve***)和 ***runt***。绝大多数初级配对-界定基因的启动子都含有一系列组件,每一个组件都有特定的对应不同间隔基因蛋白的活化位点和抑制位点。结果配对-界定基因的表达反映了相应的间隔基因蛋白的出现,导致出现斑马条带模式。和间隔基因一样,初级配对-界定基因的表达通过它们相互之间的作用而得以稳定。初级配对-界定基因的产物也可以引发或抑制 5 种**次级配对-界定基因**(secondary pair-rule gene)的表达,这其中包括 ***fushi tarazu***(***ftz***;日语:不足节)。正如 Walter Gehring 证实的,在胚胎第 10 代核分裂期间,*ftz* 转录本首先出现在线性排列在皮质胞浆中的核内。直到第 14 代分裂循环,当细胞胚盘形成时,*ftz* 在胚盘周围的 7 个条带中表达,每一个条带有 3 或 4 个细胞宽度(图 27-46)。

已知的 8 种节极性基因的表达是由配对-界定基因产物诱导的。例如,Thomas Kornberg 证实在第 13 代核分裂之前,*engrailed*(*en*)的转录本可以被检测到,却或多或少地分布于整个胚胎皮质。然而,因为在含有高浓度 Eve 或 Ftz 蛋白的核中,*en* 优先表达,所以到第 14 代核分裂之前,它们能在围绕胚盘(是 *Ftz* 表达的一半空间)的 14 个条带中显著地分布。*en* 基因产物诱导

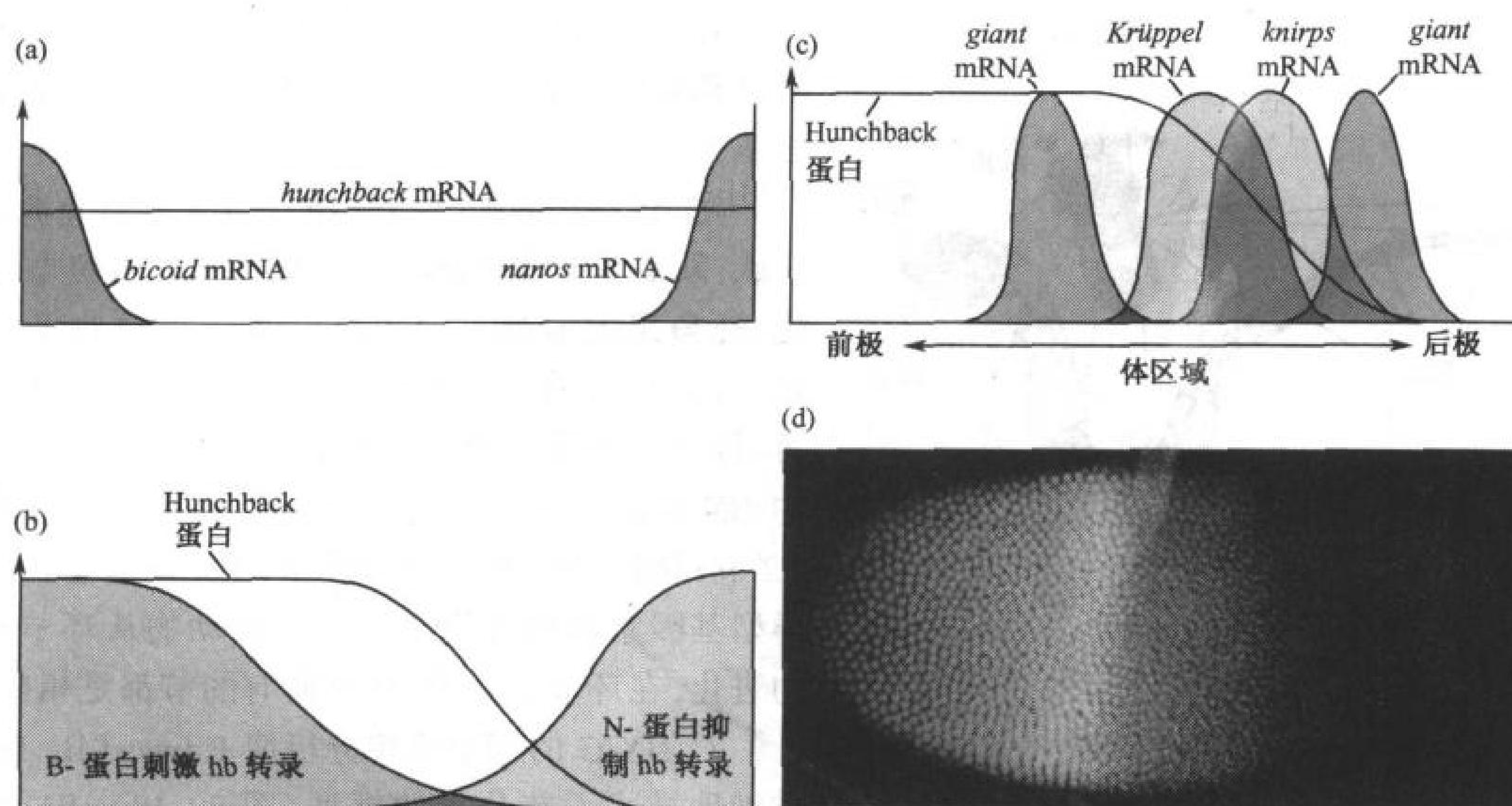


图 27-45　果蝇卵 Hunchback 蛋白浓度梯度的形成和作用

(a)未受精的卵中含有母体提供的 *biocoid* 和 *nanos* mRNA，分别处于前后两极，而 *hunchback* mRNA 均匀分布。(b)受精时，三种 mRNA 进行翻译。Biocoid 和 Nanos 蛋白并不像它们的 mRNA 那样固定在原来的地方，而大大扩宽 mRNA 的梯度。Biocoid 蛋白刺激 *hunchback* mRNA 的转录而 Nanos 蛋白起着反作用。造成了 Hunchback 蛋白从前到后的非线性梯度减少。(c)不同的 Hunchback 蛋白浓度会诱导 *giant*、*Krüppell* 和 *knirps* 基因的表达。这样 Hunchback 蛋白的梯度就决定了在什么位置这些 mRNA 的合成。(d)果蝇卵的显微照片(左端为前极)，其中 Hunchback(绿色)和 Krüppel(红色)蛋白均被免疫着色。[a, b, c(引自 Gilbert, S. F., Denelopmental Biology(5th. ed.), pp.550 和 pp.565, Sinauer Associates(1997); d, 引自 Jim Langeland, Stephen Paddock 和 Sean Carroll, University of Wisconsin-Madison]

927

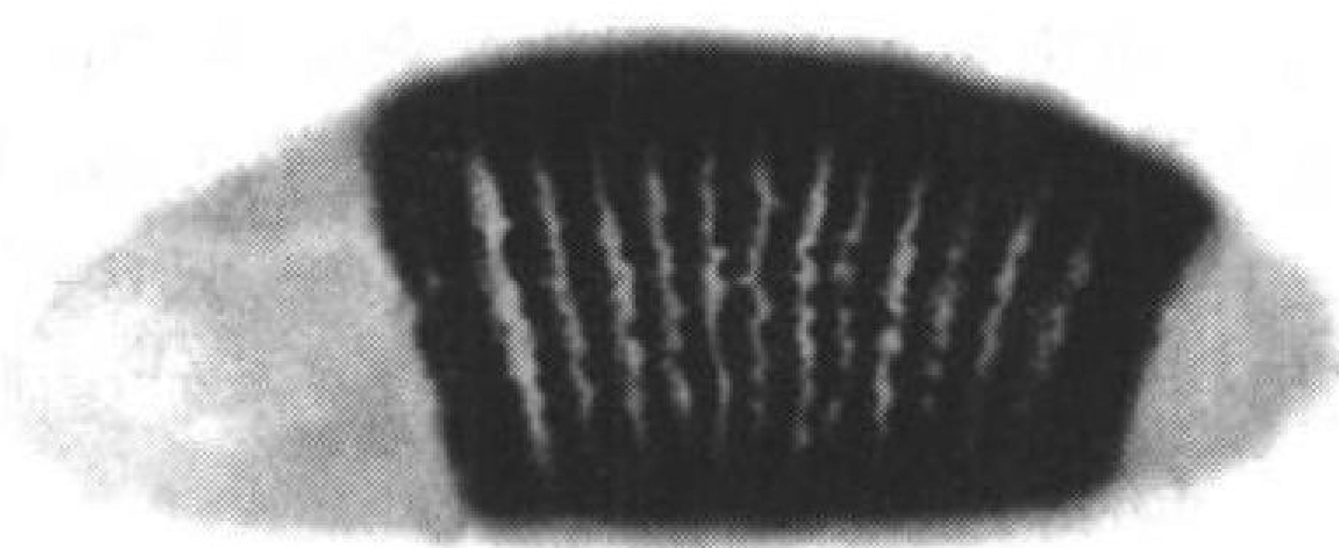


图 27-46　配对一界定基因染色的果蝇卵

Ftz 蛋白由褐色表示，Eve 蛋白由灰色表示。这些蛋白均由 7 个条带表达。(引自 Peter Lawrence, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, U. K.)

每一节的后半部分以不同于前半部分的方式发育。

同源异型基因指导个体身体部分的发育

发育上类似的身体部分的结构组分，例如果蝇的触角和腿是基本上一致的，只是在它们的组

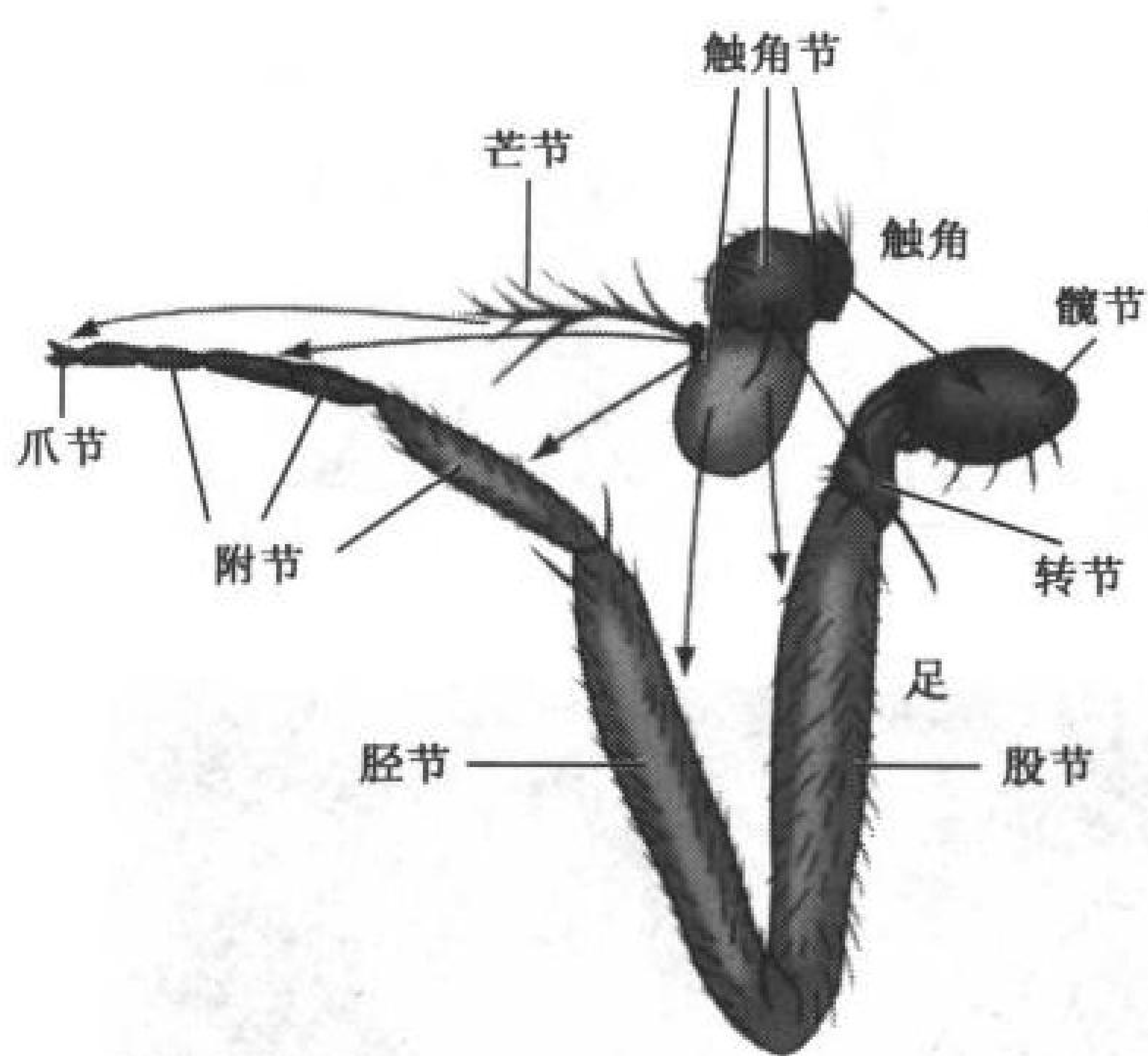


图 27-47 果蝇触角和足的相关性
[引自 Postlethwait, J. H. and Schneiderman, H. A., Dev. Biol. 25, 622(1971)]

织上有所不同(图 27-47)。因此,发育基因必须调控结构基因的表达方式而不是仅仅打开或关闭这些基因。

在果蝇中,同源异型选择基因分为两大类基因家族:**双胸复合物**(***BX-C***),调节胸节和腹节的分化;**触角足复合物**(***ANT-C***),调节头和胸节的分化。*BX-C* 的同源异型突变导致发育成更多的触角(例如,T3 节发育成 T2 节)(图 27-44b)。完全的 *BX-C* 缺失导致了 T2 节后的所有节都发育成 T2 节;显然,T2 是其后部各节的发育基态。同源异型基因家族的进化导致了节肢动物从环节动物的进化,在环节动物中,几乎所有的节都是相似的。

对 *BX-C* 的细节遗传分析使 Edward B. Lewis 详细地描述了节分化的模型(图 27-48):*BX-C* 至少含有编码 T3～A8 各节基因中的一个(在图 27-48 中的 0～8)。从节 T3 开始,后续的节会越来越多地表达 *BX-C* 基因,直到节 A8 中所有的这些基因都被表达。这种表达方式可能是因为 *BX-C* 阻遏物从前部到后部的浓度梯度递减造成的。这样节的发育状况就由它在胚胎中的位置所决定。

在 *Antennapedia*(*Antp*)基因的表征中,Gehring 和 Matthew 分别独立发现了 *Antp* cDNA 与 *Antp* 和 *ftz* 基因都杂交,表明这些基因有共同的碱基序列。后续的实验发现了一种被称作**同源异型框**(homeodomain 或 homeobox)的相似序列存在于很多果蝇同源异型基因中。这些 70%～90%同源的序列,编码同源性更高的 60 个残基的多肽片段。

927

使用同源异型框探针的进一步杂交研究令人惊讶地发现同源异型框存在于很多动物的基因组中。含有同源异型框的基因被统称为 ***Hox* 基因**。在脊椎动物中,它们形成 4 个含有 9 到 11 个基因的基因簇,每一个都处在不同的染色体上,长度超过 100 kb。而我们看到,在果蝇中含有 2 个 *Hox* 基因簇,而在线虫这种比昆虫更原始的环节动物中,只含有一个 *Hox* 基因簇。这种基因簇的不同和它们的组成基因一样,很可能是由于基因的一系列复制所造成的。

Hox 基因编码转录因子

一些 *Hox* 基因是非常同源的,例如,果蝇 *Antp* 基因和青蛙 ***MM*3 基因**的同源异型框编码的 60 个残基的多肽中有 59 个是相同的。既然脊椎动物和无脊椎动物的分化发生在 6 亿年以前,这就很能说明同源异型框的产物具有非常基本的功能。

果蝇 *engrailed* 基因的同源异型框编码的多肽结合在 *en* 和 *ftz* 基因转录起始位点的上游。而且,将 *ftz* 基因的上游序列和其他基因融合可以使之在果蝇胚胎中产生 *ftz* 式的条带(图 27-46)。这一发现表明含有同源异型框的基因编码调控其他基因表达的转录因子。

928

Thomas Korberg 和 Carl Pabo 确定了来自果蝇 Engrailed 蛋白的 61 残基的同源异型框结合 21bp DNA 所形成复合物的 X 射线衍射结构(图 27-49)。这个同源异型框含有大量的 3 个 α 螺旋,其中 2 个形成一个 HTH 基序,这一结构几乎是原核阻遏物如 λ 阻遏物中 HTH 基序(图 27-

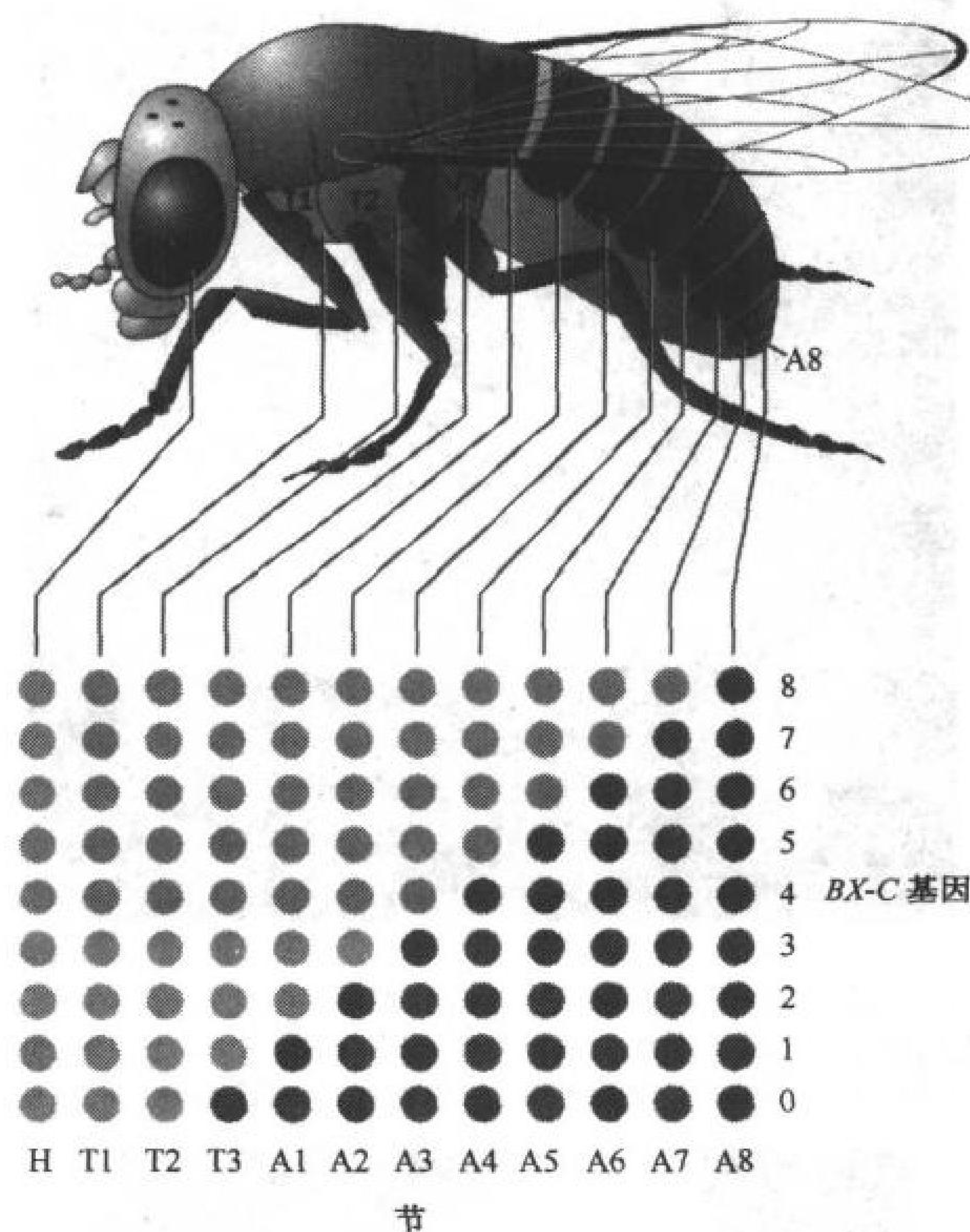


图 27-48 果蝇卵的节分化模型

浅色部分表示节 T2、T3 和 A1-A8，均有独特的活性(紫圈)和非活性(黄圈) *BX-C* 基因组合方式。标号 0～8 的这些基因，被认为是在卵中从前极到后极顺序活化的，所以，发育上最原始的 T2 节，没有活性 *BX-C* 基因，而 A8 节中，所有的 *BX-C* 基因均有活性。[引自 Ingham, P., Trends Genet. 1. 113(1985)]

25)的两倍。而这两种蛋白中，作为 HTH 基序识别螺旋的螺旋 3 与 DNA 大沟的相互作用是不同的。例如，在 λ 阻遏物复合物中，识别螺旋的 N 端插入到大沟中，而在同源异型框复合物中，识别螺旋的 C 端比 λ 阻遏物的长，是这一部分插入到大沟中。

脊椎动物的 *Hox* 基因，和果蝇中一样，以一种特殊的方式表达，并且出现在胚胎发育的特定阶段。例如，后面的实验可以表明 *Hox* 基因直接确定胚胎细胞的身份和将来的发展。虽然 *Hox-1.1* 只在颈下的范围表达，但是实验中，制备了这样的鼠胚胎，通过转基因将 *Hox-1.1* 基因置于一个在身体各部分都活泼的启动子的控制下。产生的鼠有好几种颅面畸形，如：上颚裂缝、多余的脊椎、头骨基部的无脊椎盘。有一些还在颈部出现了多余的肋骨。改变 *Hox-1.1* 基因的表达导致了同源异型突变，从而改变了发育模式，这和在果蝇中观察到的现象类似(图 27-44)。

Hox-3.1 编码序列被 *lacZ* 序列取代的纯合子小鼠可以出生但却在几天内死亡。在它们的躯干部分发生了骨骼畸形，一些骨骼被更靠前部分(发育顺序上)的类似物所取代。使用水解产物为蓝色的底物类似物，通过比色法确定 β-半乳糖苷酸的活性的实验表明，*Hox-3.1* 的缺失改变了正常表达 *Hox-3.1* 基因的胚胎细胞的特性，但是不能改变它们的位置。

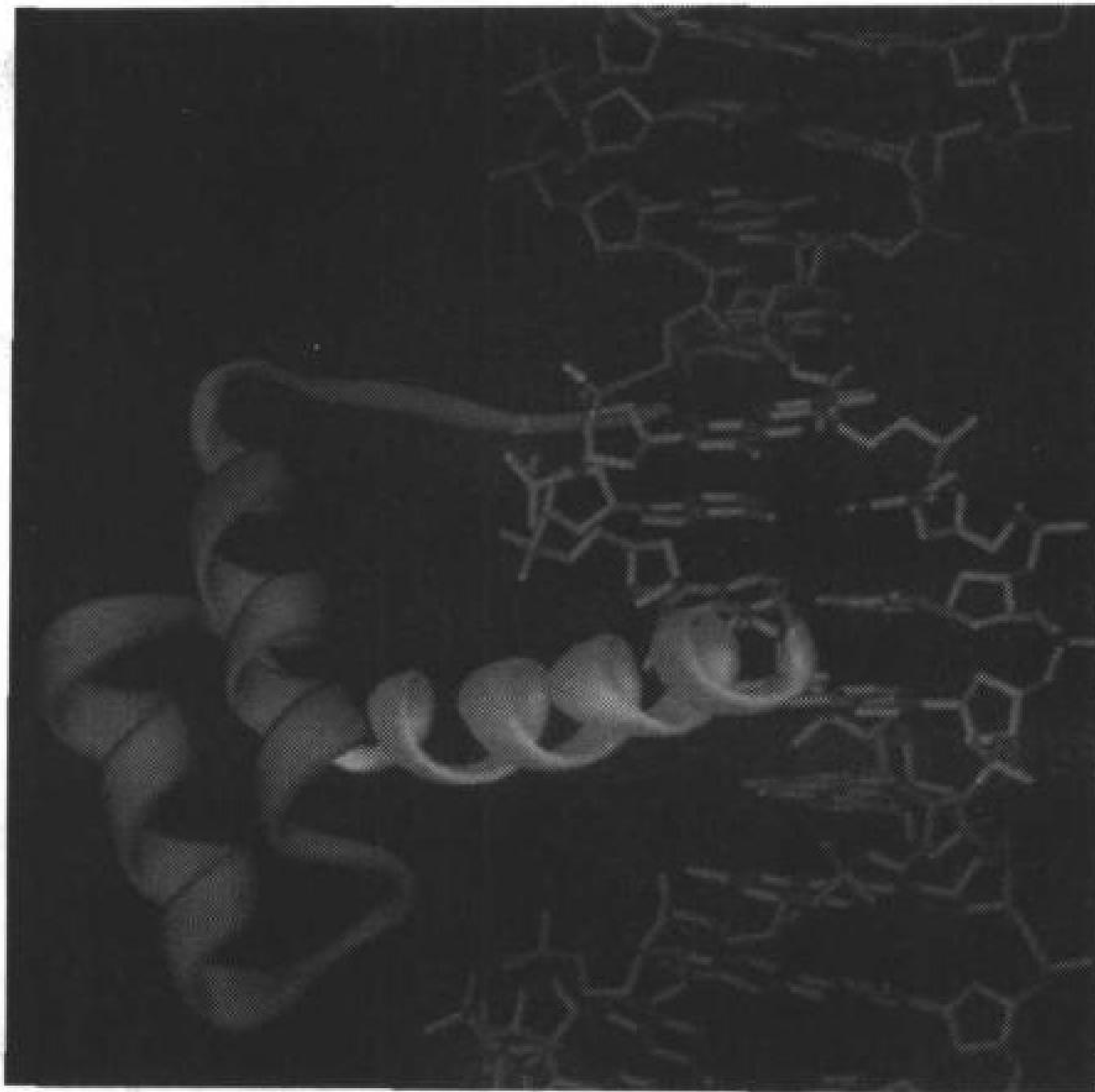


图 27-49 Engoailed 蛋白的同源异型框结合靶 DNA 复合物的 X 射线结构图

条带状表示的是蛋白质(绿色),它的识别螺旋(螺旋 3,黄色)结合在 DNA 的大沟中。N 末端(红色)结合在小沟中。棒状表示的是 DNA(蓝色),其碱基对中的 TATA 单元用高亮的紫红色表示。(引自 Corl Pabo, The Iohns Hopkins University)



图 27-50 12.5 天的鼠胚中 *Hox-3.1* 基因表达图

Hox-3.1 基因的蛋白质编码部分被 *LacZ* 基因取代。胚胎浸泡在含有被 *lacZ* 基因产物水解后会变蓝的底物——β 半乳糖的缓冲液中,*Hox-3.1* 表达的基因突变胚胎的这些区域会显现出来。(引自 Phillipe Brûlet, Collège de France and Institut Pasteur, France)

小　结

1. 机体的完整基因组使得通过可读框和已知功能基因之间的同源性来确定基因组分的功能以及它的代谢能力成为可能。
2. 某些基因成簇出现，例如，细菌的操纵子基因、rRNA 和 tRNA 基因、真核细胞的组蛋白基因。人类的球蛋白基因簇包括了在不同发育阶段表达的各种基因。
3. 原核基因组包括少量的非转录 DNA，其中包括调控复制和转录的区域。高等真核生物基因组含有大量以重复序列和转座子残基形式存在的非转录 DNA。
4. 原核基因表达在转录水平调控。乳糖操纵子通过阻抑物与操纵基因序列的结合来进行调节。这种抑制操纵基因转录的结合可以通过在乳糖阻抑物上结合诱导物来逆转，这种诱导物的出现表明乳糖操纵子编码的酶的作用底物乳糖可以被利用。
5. 在副产物抑制中，作为葡萄糖缺乏信号的 CAP-cAMP 复合物结合到 DNA 诱导参与其他糖类代谢的蛋白的编码基因进行转录。
6. 衰减作用是这样一种机理，翻译依赖的操纵子前导序列中选择性的 mRNA 二级结构的形成决定转录过程是前进还是终止。
7. λ 噬菌体的裂解生长需要反终止子 gp*N*、gp*Q* 和抑制 λ 阻遏物转录的 Cro 蛋白的顺序表达。溶原生长需要 λ 阻遏物，它抑制除自身以外的所有 λ 基因的表达。从溶原生长到裂解生长的转换依赖于是 Cro 蛋白还是 λ 阻遏物出现在它们共同的操纵基因序列上。
8. 转录活泼的真核 DNA 没有“沉默”DNA 那样高度的浓缩。可逆的组蛋白乙酰化被认为调控核小体对转录机器的可接近程度。
9. “上游”转录因子结合到增强子或沉默子序列并结合到前起始复合物(PIC)来调控基因表达。这些因子包括 STAT 和类固醇受体，它们都对细胞外信号产生反馈；还有肿瘤抑制子，它被 cyclin 依赖的蛋白激酶所调控。
10. 抗体多样性由体细胞重组产生，体细胞重组包括编码免疫球蛋白轻链和重链片段的簇状基因序列的重新排列。*V*/*D*/*J* 结合的不准确性和体细胞高变增加了这种多样性。
11. 真核基因表达的调控还有选择性剪切、mRNA 降解的多变性、翻译水平上的调控。
12. 果蝇胚胎的发育受决定胚胎极性的母体基因的调控；受决定胚胎形成的体节的数目和极性的间隔基因、配对-界定基因和节极性基因的调控；另外还受到同源异型选择基因(*Hox* 基因)的调控，*Hox* 基因编码调控基因表达的转录因子从而控制细胞的分化。*Hox* 基因也对脊椎动物的发育有类似的调控。

参 考 文 献

基因组

Lander, E.S., The new genomics: global views of biology, *Science* **274**, 536–539 (1996). [An exposition of the goals of genome sequencing, focusing on the human genome.]

Pearson, C.E. and Sinden, R.R., Trinucleotide repeat DNA structures: dynamic mutations from dynamic DNA, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 321–330 (1998).

Strauss, E.J. and Falkow, S., Microbial pathogenesis: genomics and beyond, *Science* **276**, 707–712 (1997). [Discusses some practical outcomes of studying microbial genomes.]

原核基因表达

Kolb, A., Busby, S., Buc, H., Garges, S., and Adhya, S., Transcriptional regulation by cAMP and its receptor protein, *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 749–795 (1993).

Lewis, M., Chang, G., Horton, N.C., Kercher, M.A., Pace, H.C., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., and Lu, P., Crystal structure of the lactose operon repressor and its complexes with DNA and inducer, *Science* **271**, 1247–1254 (1996).

Matthews, K.S. and Nichols, J., Lactose repressor protein: Functional properties and structure, *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **58**, 127–164 (1998).

Ptashne, M., *A Genetic Switch* (2nd ed.), Chapters 1–4, Cell Press & Blackwell Scientific Publications (1992). [A detailed description of the bacteriophage λ genetic switch.]

Yanofsky, C., Transcription attenuation, *J. Biol. Chem.* **263**, 609–612 (1988). [A general discussion of attenuation.]

真核基因表达

Adams, C.C. and Workman, J.L., Nucleosome displacement in

transcription, *Cell* **72,** 305–308 (1993).
Beato, M., Herrlich, P., and Schütz, G., Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot, *Cell* **83,** 851–857 (1995). [Reviews actions of steroid hormone receptors and their interactions with transcription factors.]
Beelman, C.A. and Parker, R., Degradation of mRNA in eukaryotes, *Cell* **81,** 179–183 (1995).
Cho, Y., Gorina, S., Jeffrey, P.D., and Pavletich, N.P., Crystal structure of a p53 tumor suppressor–DNA complex: understanding tumorigenic mutations, *Science* **265,** 346–355 (1994).
Darnell, J.E., Jr., STATs and gene regulation, *Science* **277,** 1630–1635 (1997).
Dynlacht, B.D., Regulation of transcription by proteins that control the cell cycle, *Nature* **389,** 149–152 (1997).
Gao, C.Y. and Zelenka, P.S., Cyclins, cyclin-dependent kinases and differentiation, *BioEssays* **19,** 307–314 (1997).
Gilbert, S.F., *Developmental Biology* (5th ed.), Chapter 14, Sinauer Associates (1997).
Grunstein, M., Histone acetylation in chromatin structure and transcription, *Nature* **389,** 349–352 (1997).
Lewis, S.M. and Wu, G.E., The origins of V(D)J recombination, *Cell* **88,** 159–162 (1997).
Mitas, M., Trinucleotide repeats associated with human disease, *Nucl. Acids Res.* **25,** 2245–2253 (1997).
Nüsslein-Volhard, C., Gradients that organize embryo development, *Sci. Am.* **272**(7), 54–61 (1996).
Ptashne, M. and Gann, A., Transcriptional activation by recruitment, *Nature* **386,** 569–577 (1997). [A broad review of how regulatory factors and the transcription machinery cooperate in gene expression.]
Schatz, D.G., Oettinger, M.A., and Schlissel, M.S., V(D)J recombination: molecular biology and regulation, *Annu. Rev. Immunol.* **10,** 359–383 (1992).
Tijan, R. and Maniatis, T., Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces, *Cell* **77,** 5–8 (1994). [An overview of eukaryotic gene regulation through modular binding of transcription factors.]
Wolberger, C., Homeodomain interactions, *Curr. Opin. Struct. Biol.* **6,** 62–68 (1996).

关 键 词

基因表达 gene expression
基因组学 genomics
C值 C value
C值矛盾 C-value paradox
可读框 ORF
基因簇 gene cluster
着丝点 centromere
高度重复序列 highly repetitive sequences
卫星 DNA satellite DNA
中度重复序列 moderately repetitive sequences
自私 DNA selfish DNA
阻遏物 repressor
诱导因子 inducer
操纵基因 operator
副产物抑制 catabolite repression
正调节 positive regulator
负调节 negative regulator
辅阻遏物 corepressor
前导序列 leader sequence
衰减作用 attenuation
溶原模式 lytic mode
裂解模式 lysogenic mode
前噬菌体 prophage
溶原体 lysogen
诱导 induction
定点重组 site-specific recombination
异染色质 heterochromation
常染色质 euchromatin
巴尔体 Barr body
多线染色体 polytene chromosome
染色质肿块 chromosome puff
增强子 enhancer
沉默子 silencer
转录活化子(STAT) STAT
激素响应元件 hormone response element
肿瘤抑制物 tumor suppressor
细胞程序死亡 apoptosis
体细胞组 somatic recombination
体细胞突变 somatic mutation
去嘌呤化 edadenylation
多核体 syncytium
囊胚层 blastoderm
原肠胚形成 gastrulation
器官芽 imaginal disk
母体基因 maternal-effect gene
分节基因 segmentation gene
间隔基因 gap gene
配对-界定基因 pair-rule gene
节极性基因 segment polarity gene
成形素 morphogen
同源异型选择基因 homeotic selector gene
同源异型框 homeodomain
Hox 基因 *Hox* gene

学习思考题

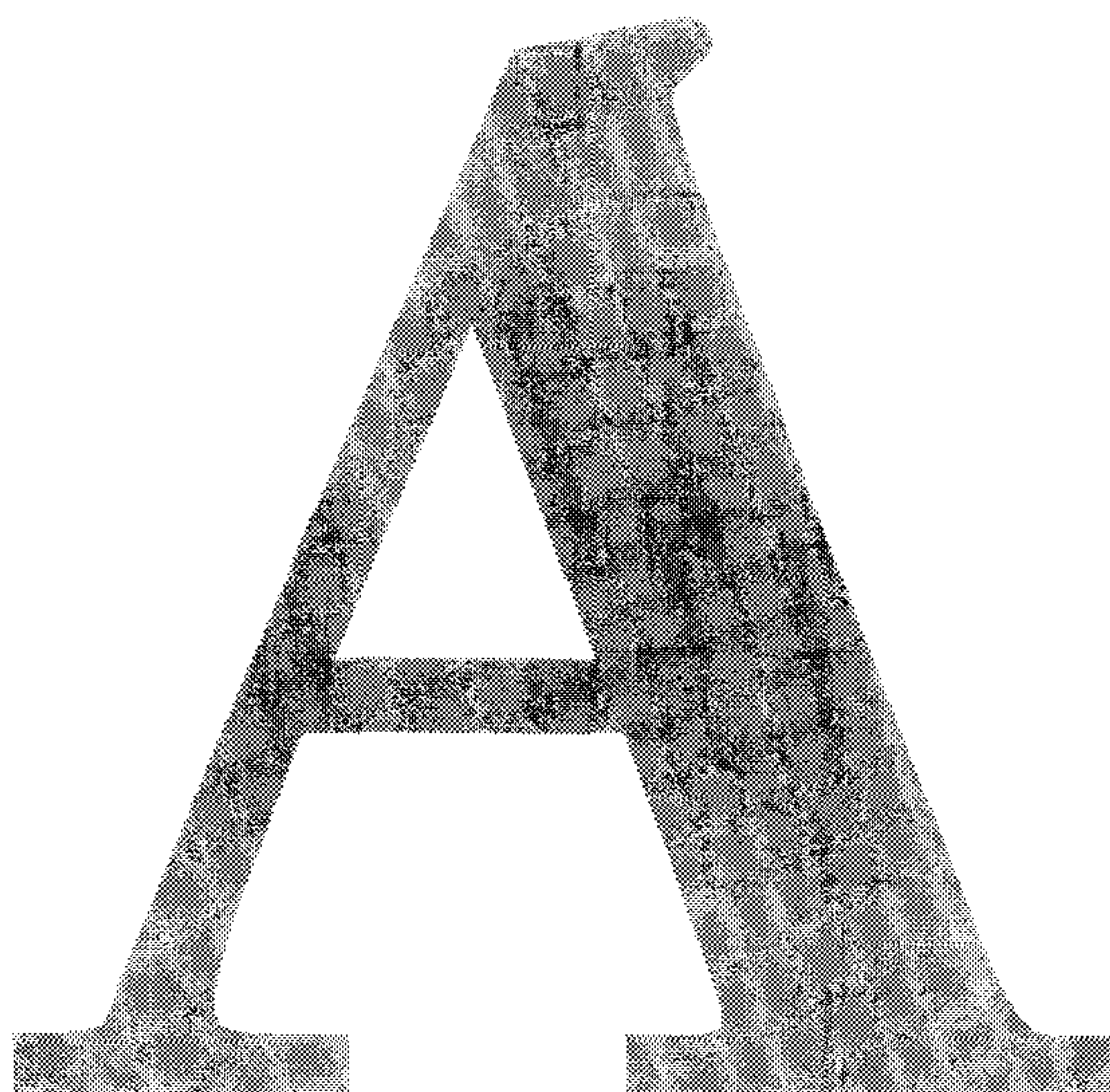
1. 列举出真核生物基因组比原核生物基因组大的几条因素。
2. 列举出一些可读框的功能不能被检测到的原因。
3. 为什么通常是 rRNA 和 tRNA 基因,而不是编码蛋白的基因出现在基因簇中?
4. 描述 *lac* 阻遏物和 CAP 对 *lac* 操纵子的调控。
5. 弱化子是如何调控基因表达的。
6. 描述 λ 噬菌体遗传开关的作用机理?
7. 组蛋白修饰是如何影响真核细胞转录的起始?
8. 为什么增强子和启动子之间的距离是不定的?
9. 说明抗体多样性是如何产生的。
10. 描述果蝇的胚胎是如何形成的。

练　习　题

1. 从一个生物体中分离的 DNA 可以被剪切成固定长度的片段(约 300bp),热处理使之延展成单链,然后冷却使互补链复性,一段时间后即出现复性过程。解释一下为什么 *E. coli* DNA 的复性是一级过程而人类 DNA 的复性是二级过程(一个开始的快相过程,后面是慢相过程)。
2. 在细菌基因组中,为什么操纵子的基因组织过程可以促进对先前无法识别的可读框分配功能。
3. 解释一下为什么:a. *lac* 阻遏物 O_1 序列的失活会导致对 *lac* 操纵子抑制作用的完全废止;b. O_2或 O_3 序列的失活只能使这种抑制作用减半;c. 而 O_2和 O_3 序列的同时失活导致这种抑制作用减弱 70%。
4. 为什么缺少 *lacZ* 基因的 *E. coli* 细胞在没有葡萄糖的情况下加入半乳糖时不能表现出半乳糖苷酶的活性?
5. 可能是什么样的基因缺失会导致在其他代谢操纵子能保持对缺少葡萄糖的敏感性的情况下,而 *lac* 操纵子却丧失了这一敏感性?
6. 为什么真核生物的转录过程不能为衰减机制调控?
7. 前导多肽序列的删除会对 trp 操纵子的调控产生什么样的影响?
8. 下列后续基因:a. N;b. cII;c. cro 分别被删除会对 λ 噬菌体的生命循环产生什么样的影响?
9. 转录增强子是否有可能位于蛋白编码序列之中,为什么?
10. 为什么自然选择受益于 RNA 的不稳定性?
11. 为什么 *esc*$^-$ 型纯合子的果蝇可以正常的发育,除非它的母亲也是同样的纯合子?

(郑昌学　刘　征　译)

附　　录



附　　录

词　汇　表

问 题 解 答

常用缩略语

索　　引

词 汇 表

数字和希腊字按它们拼写字母的顺序排列。

ab initio 从头开始

ABO blood group antigens ABO 血型抗原

红细胞和其他细胞表面糖脂的寡糖成分。

absolute configuration 绝对构型

围绕手性中心化学基团的空间排列。

abzyme 抗体酶

能催化化学反应的抗体,很像酶。

accessory pigment 辅助色素

光合系统中,与叶绿素吸收波长不同的一种吸收光波的分子。

acid 酸

能给出质子的物质。

acid-base catalysis 酸碱催化

通过酸转移部分质子和(或)碱获得部分质子,从而降低反应过渡态自由能的一种催化机制。

acidic solution 酸性溶液

pH 值低于 7.0 的溶液(即$[H^+]>10^{-7}mol\cdot L^{-1}$)

acidosis 酸中毒

血液 pH 值低于其正常值 7.4 时的一种病理状况。

active site 活性中心

酶发生催化反应的部位。

active transport 主动运输

物质从低浓度到高浓度的跨膜转运,需要一种蛋白质将这种耗能转运与另一种产能过程如 ATP 的水解相偶联。

acyl group 酰基

分子中化学式为—COR 的部分,R 代表烷基。

adenylate cyclase system 腺苷酸环化酶系统

一种信号转导途径,在该途径中,激素与细胞表面的受体结合后激活 G 蛋白,G 蛋白再激活腺苷酸环化酶,从而将 ATP 合成为第二信使 3′,5′-环腺苷酸(cAMP)。

adenylylation 腺苷酰化

加一个腺苷酰(AMP)基。

adipose tissue 脂肪组织

脂肪细胞;遍布于动物体的各个部位。

aerobe 需氧生物

利用 O_2 作为氧化剂分解营养物的生物。

affinity chromatography 亲和层析

利用一种分子能专一地结合到固定化配体上的能力,从而将其与混合物中的其他分子分开的过程。

affinity labeling　亲和标记

利用标记底物类似物与酶活性中心的不可逆反应，来确定酶活性中心基团的一种技术。

agarose　琼脂糖

由红藻制取的线性糖多聚物，它形成疏松网孔。

agarose gel electrophoresis　琼脂糖凝胶电泳

见 gel electrophoresis（凝胶电泳）。

alcoholic fermentation　乙醇发酵

通过脱羧和还原反应，从丙酮酸合成乙醇的代谢途径。

alditol　多羟糖醇

由醛糖或酮糖还原为多羟醇时产生的糖。

aldonic acid　醛糖酸

醛糖的醛基氧化为羧基时产生的糖。

aldose　醛糖

羰基为醛基的糖。

alkalosis　碱中毒

血液 pH 值超过正常值 7.4 时的一种病理状况。

allosteric effector　别构效应物

小分子物质，与蛋白质结合后会影响该蛋白质另一部位的功能。

allosteric interaction　别构相互作用

大分子的一个部位结合配体后，影响该分子中另一部位与另一配体的结合。见 cooperative binding(协同结合)。

α-amino acid　α-氨基酸

见 amimo acid(氨基酸)。

α anomer　α-异头物

见 anomers(异头物)。

α/β barrel　α/β 桶

由 α-螺旋连接的连续平行的 β 链，形成 α 螺旋桶围绕的 β 桶状结构。

α-carbon　α-碳原子

氨基酸中连接氨基和羧基的碳原子。

α-cell　α-细胞

低血糖时，分泌胰高血糖素的一类胰岛细胞。

α helix　α 螺旋

多肽的一种有规则的二级结构，每圈右手螺旋含 3.6 个残基，螺距 5.4Å，每个主链的 N—H 基团与其前面 4 个残基的 C═O 基团之间形成氢键。

Alzheimer's disease　阿尔茨海默病(老年性痴呆)

在脑中以 β 淀粉样蛋白沉淀为特征的一类神经退行性疾病。

Ames test　埃姆斯试验

根据一种化合物使基因缺陷型菌株回复到正常生长的能力，从而估价该化合物致突变性的方法。

amido group 酰胺基

分子中化学式为—CONH—的部分。

amino acid 氨基酸

由连有一个伯氨基、一个羧酸基、一个侧链(R 基团)和一个氢原子的碳原子组成的化合物，也称 α-氨基酸。

amino acid composition 氨基酸组成

多肽中氨基酸的种类和数目。

amino group 氨基

分子中化学式为—NH_2、—NHR 或—NR_2 的部分，R 为烷基。在生理 pH 条件下，氨基常被质子化。

amino sugar 氨基糖

一个或多个羟基被氨基取代的糖，氨基常被乙酰化。

amino terminus 氨基端

多肽链中有游离氨基的末端，也称 N 端。

aminopeptidase 氨肽酶

催化水解切除多肽 N 端残基的酶。

amphibolic 两用(代谢途径)

既可用于分解又可用于合成的代谢过程。

amphipathic substance

见 amphiphilic substance(两亲性物质)。

amphiphilic substance 两亲性物质

既有极性区域又有非极性区域，因此既亲水又疏水的物质，也称 amphipathic substance。

amyloid deposit 淀粉样蛋白沉积

组织中某种不溶性蛋白质累积，如脑部的阿尔茨海默病。

anabolism 合成代谢

由较简单组分合成生物大分子的反应。

anaerobe 厌氧菌

一种不利用氧作为氧化剂降解营养物质的生物。专性厌氧菌在氧存在时不能生长，而兼性厌氧菌在氧存在或缺乏时均能生长。

anaplerotic reaction 回补反应

补充代谢中间物的反应。

anion exchange 阴离子交换

阴离子分子结合到阳离子基质上的层析过程。

anneal 复性

维持某一条件，使互补多核苷酸单链之间相互配对，从而形成严格配对的双链片段。

annular lipids 环形脂

以一种特殊方式围绕膜蛋白的膜脂。

anomeric carbon 异头碳

当糖环化成半缩醛或半缩酮时，成为手性中心的单糖的羰基碳。

anomers 异头物

仅仅是异头碳构型不同的糖。在 α 异头物中，异头碳的羟基取代基与指明 D 型或 L 型的手性中心的 CH_2OH 基在环的两侧，在 β 异头物中，羟基取代基与 CH_2OH 基在环的同侧。

antibody 抗体

为应答外来物质(抗原)的侵入，由动物免疫系统产生的蛋白质；它至少含有两对相同的重链和轻链。也称免疫球蛋白(Ig)。

anticodon 反密码子

tRNA 上通过互补碱基配对，识别 mRNA 密码子的三个核苷酸序列。

antigen 抗原

进入动物体内，引起免疫应答(抗体的产生)的一类物质；它被抗体特异性识别。

antioxidant 抗氧化剂

清除氧自由基如 O_2^-·或 OH·的一类物质。

antiparallel 反平行

走向相反。

antiport 反向转运

两种分子同时以反方向跨膜运输。

antisense strand 反义链

作为转录模板的 DNA 链；它与 RNA 互补。也称非编码链。

antiterminator 抗终止子

阻止转录终止的蛋白质。

AP site AP 位点

无嘌呤或无嘧啶位点；DNA 链上除去碱基后留下的脱氧核糖残基。

apoenzyme 脱辅基酶

因缺乏辅助因子而失活的酶。

apolipoprotein 载脂蛋白

脂蛋白中的蛋白质组分。也称脱辅基蛋白(apoprotein)。

apoprotein 脱辅基蛋白

缺少维系完整活性的辅基或金属离子的蛋白质。见 apoenzyme(辅酶)和 apolipoprotein(载脂蛋白)。

aptamer 高适应性核苷酸

构象上允许和特定配体以高特异性和高亲和力结合的核苷酸。

archaea 古细菌

原核生物两个主要种类中的一种(另一类是真细菌)，也称为 archaebacteria(古细菌)。

archaebacteria 古细菌

见 archaea(古细菌)。

assay 测定

检测大分子或其活性的一种实验技术，有时也用于定量。

asymmetric center 不对称中心

见 chiral center(手性中心)。

atherosclerosis 动脉粥样硬化

血管壁上有胆固醇纤维样动脉粥样斑形成，从而导致血管壁弹性减小和阻碍血流的一种病。

ATP mass action ratio ATP 质量作用比

$[ATP]/[ADP][P_i]$的比值，它影响电子传递和氧化磷酸化的速率。

ATPase ATP 酶(腺苷三磷酸酶)

催化 ATP 水解成 ADP 和 P_i 的酶。

attenuation 衰减(作用)

原核生物调节基因表达的一种机制，在该机制中，氨基酸的存在量决定了相应操纵子(由合成氨基酸的酶基因组成)是否被转录。

attenuator 弱化子，衰减子

原核生物的调控元件，调控操纵子的转录，而转录受操纵子编码的蛋白质合成一种氨基酸的存在决定。

autocatalytic reaction 自身催化反应

产物分子可作为该反应催化剂的化学反应；反应分子看起来就像催化自身的反应。

autoimmune disease 自身免疫疾病

免疫系统丧失了部分免疫自体耐受性，从而对某些自身抗原产生抗体的一类疾病。

autolysis 自溶作用

一种分子催化其自身降解的催化过程。

autophosphorylation 自身磷酸化

由激酶催化自身或相同分子的磷酸化反应。

autoradiography 放射自显影

用 X 线片记录固定在某种介质上的放射性蛋白质或核酸位置的方法，介质可为纤维素或电泳凝胶。

autotroph 自养生物

利用太阳光的能量(光能自养生物)或氧化无机物的能量(化能自养生物)，能从简单分子合成它的所有细胞组分的一类生物。

axial substituent 垂直取代基

与环平面垂直相连的基团。见 equatorial substituent(赤道取代基)。

backbone 主链

除了侧链以外，多聚分子连续残基之间重复连接的原子。也称 main chain (主链)。

bacteria 细菌

包括两类主要原核生物，即古细菌和真细菌。

bacteriophage 噬菌体

以细菌为宿主的一类病毒。也称 phage(噬菌体)。

base 碱基

(1)能接受质子的一类物质。(2)核苷、核苷酸或核酸的嘌呤或嘧啶组分。

base pair 碱基对

核酸碱基对之间特异的氢键结合。标准碱基对是 A·T 和 G·C。

basic solution 碱性溶液

pH 值大于 7.0($[H^+]<10^{-7}mol\cdot L^{-1}$)的溶液。

beriberi 脚气病

由于缺乏硫胺素(维生素 B_1)引起的疾病,硫胺素是辅因子硫胺素焦磷酸的前体。

β anomer β异头物

见 anomers(异头物)。

β barrel β桶

由β片层卷成圆筒形的一种蛋白质的模体。

β bend β转角

见 reverse turn(回折)。

β bulge β凸

在β片层中,由于额外残基与邻近链不是以氢键相连,从而形成的不规则结构。

β cell β细胞

高血糖时,分泌胰岛素的一类胰岛细胞。

β hairpin β发夹

两条反平行的β链,通过转角连接而成的一种蛋白质模体。

β oxidation β氧化

一系列的酶催化反应,在该反应中,脂肪酸以乙酰 CoA 形式被移去二碳单位而逐步被降解。

β sheet β折叠

伸展的多肽链形成链间氢键的一种规则的二级结构。在平行β折叠中,多肽链的走向相同;在反平行β折叠中,相邻链的走向相反。

bilayer 双层

两亲分子的一种有序的双层排列,在该排列中,极性部分朝向暴露溶剂的两表面,而非极性部分则缔合在中间。

bile acid 胆汁酸

作为去污剂将脂质溶解以便消化和吸收的一种两亲性胆固醇衍生物。

binding change mechanism 结合交换机制

ATP 合酶的亚基采用三种连续的构象,通过消耗跨膜质子梯度,将 ADP + P_i 转变为 ATP 的一种机制。

blunt ends 平端

DNA 双链被限制性内切核酸酶在相对位点切割后产生的具有完整碱基对的 DNA 片段末端。

Bohr effect Bohr 效应

pH 值升高时,血红蛋白增加与氧结合的亲和力。

bovine spongiform encephalopathy 牛海绵状脑病

牛感染了朊病毒导致的一种致命性神经退行性疾病;它类似于羊的搔痒症和人的克雅氏(Creutzfeldt-Jakob)病。也称为疯牛病。

bp 碱基对

DNA 分子长度的单位,一千个碱基对缩写为 kb。

buffer 缓冲液

一种弱酸及其大约相等量的共轭碱的溶液。加入酸或碱时,该溶液可抵抗 pH 值的变化。

buffering capacity 缓冲能力

加入酸或碱时,缓冲液抵抗 pH 值变化的能力。当 pH 值在它的组成酸的 pK 值一个单位以内时,缓冲是最有效的。

C_4 cycle C_4 循环

仅在某些植物中发生的一种光合作用,在该过程中,CO_2 首先通过掺入草酰乙酸(一种四碳化合物)而被浓缩。

Cahn-Ingold-Prelog system (RS system) Cahn-Ingold-Prelog 系统(RS 系统)

通过对每个不对称中心的取代基团优先次序的指认,用一个或多个不对称中心明确描述分子构型的一种系统。

Calvin cycle 卡尔文循环

光合作用暗反应的顺序,在该顺序中,核酮糖-5-磷酸被羧化,转变为三碳糖的前体,然后再生。也称还原性戊糖磷酸循环。

CAM

见 crassulacean acid metabolism(景天酸代谢)。

cap 帽子

翻译后附加到真核生物 mRNA 5′端的 7-甲基鸟苷残基。

capillary electrophoresis(CE) 毛细管电泳

在直径很小的毛细管中进行的电泳过程。

carbamate 氨基甲酸

二氧化碳和氨基之间反应的产物:—NH—COO$^-$。

carbohydrate 碳水化合物

分子式为$(C\cdot H_2O)_n$, $n\geqslant3$ 的化合物。也称为糖。

carbonyl group 羰基

分子中化学式为 >C═O 的部分。

carboxyl group 羧基

分子中化学式为—COOH 的部分。在生理 pH 下,羧基通常被离子化。

carboxyl terminus 羧基端

有自由羧基的多肽末端。也称 C 端。

carboxypeptidase 羧肽酶

催化水解多肽 C 端残基的酶。

carcinogen 致癌物

损伤 DNA 以致引起突变的试剂,该突变导致细胞增殖无法控制(癌症)。

catabolism 分解代谢

将营养物和细胞组分降解,以获得能量和原料的降解代谢反应。

catabolite repression 分解代谢物阻遏作用

葡萄糖的存在阻止涉及其他燃料代谢的基因表达的一种现象。

catalyst 催化剂

能促进化学反应,但本身不发生变化的一种物质。催化剂加快反应达到平衡的速率,但不影

响反应自由能的变化。

catalytic triad　催化三联体

以氢键结合的丝氨酸、组氨酸和天冬氨酸残基参与了丝氨酸蛋白酶的催化作用。

catenate　连环

像连接链条一样互连环状的 DNA 分子。

cation exchange　阳离子交换

阳离子分子结合到阴离子介质上的一种层析过程。

CCAAT box　CCAAT 框

真核生物的启动子元件，它是定位在转录起始位点上游 70～90 个核苷酸的 CCAAT 的共有序列。

CE　毛细管电泳

见 capillary electrophoresis(毛细管电泳)。

cell cycle　细胞周期

真核细胞分裂时的顺序事件；它包括有丝分裂和细胞分裂(M 期)、间期(G_1 期)、DNA 合成期(S 期)和下一个 M 期之前的第二间期(G_2 期)。

cellular immunity　细胞免疫

T 淋巴细胞(T 细胞)介导的免疫。

central dogma of molecular biology　分子生物学的中心法则

中心法则认为 DNA 指导其自身复制以及转录成 RNA，然后翻译成多肽。信息的流向是从 DNA 到 RNA，再到蛋白质(DNA→RNA→蛋白质)。

centromere　着丝粒

细胞分裂时，和有丝分裂的纺锤体相连的真核生物染色体区域，它包含高度重复 DNA 序列。

ceramide　神经酰胺

酰基连接到鞘氨醇的氨基上形成的鞘氨醇的衍生物。

cerebroside　脑苷脂

以糖残基作为头部的一类神经酰胺。

chain-termination procedure　链终止法

利用双脱氧核苷酸产生一套不同长度的子链来测定 DNA 核苷酸序列的一种技术。也称双脱氧法。

channeling　通道

中间产物从一个酶的活性中心转移到另一个酶的活性中心，以这种方式使中间产物保持与蛋白质的接触。

chaotropic agent　促溶剂

一种能增加非极性物质在水中溶解度的物质，因此使蛋白质变性。

chaperonins　伴侣蛋白，分子伴侣

由 Hsp60 蛋白和 Hsp10 蛋白(大肠杆菌中的 GroEL 和 GroES)组成的像笼子一样大的陪伴分子，它为蛋白质的折叠提供了一个保护性微环境。

Chargaff's rule　Chargaff 规则

Erwin chargaff 首次发现 DNA 中具有相等量的腺嘌呤和胸腺嘧啶残基，以及具有相等量的鸟嘌呤和胞嘧啶残基。

chemiosmotic theory 化学渗透理论

电子传递的自由能保存在形成的跨膜质子梯度中的一种假设，这种梯度的电化学势被用来驱动 ATP 的合成。

chemolithotroph 化能无机营养生物

从无机物的氧化中获得能量的自养生物。

chimera 嵌合体

见 recombinant(重组体)。

chiral center 手性中心

指一个原子的取代基被安排成不能与它的镜像重叠。也称不对称中心。

chirality 手性

不对称性，一个手性分子不能与它的镜像互相重叠。

chloroplast 叶绿体

植物中进行光合作用的细胞器。

chromatin 染色质

由 DNA、RNA 和蛋白组成的复合物，它构成了真核生物的染色体。

chromatography 层析

根据混合物中各组分在流动相和多孔介质(固定相)之间分配的不同，从而将各种组分分开的一种技术。

chromosome 染色体

由蛋白质、RNA 和单个 DNA 分子组成的复合物，DNA 分子包含了部分或全部生物体的基因组。

chromosome puff 染色体胀泡

多线染色体被去凝聚以便于基因转录的部分。

chylomicrons 乳糜微粒

将食物中的甘油三酯和胆固醇从小肠转运到组织中的脂蛋白颗粒。

***cis* peptide** 顺式肽

连续的 $C\alpha$ 原子位于肽键同一侧的一种构象。

citric acid cycle 柠檬酸循环

一组 8 个酶反应，形成一个循环。在该循环中，自由能以 ATP、NADH 和 $FADH_2$ 的形式从乙酰 CoA 的乙酰基氧化成二氧化碳的反应中回收。也称 Krebs 循环和三羧酸(TCA)循环。

clone 克隆

从一个祖先衍生来的一组相同的细胞。

cloning 克隆，无性繁殖

产生一个 DNA 片段的精确拷贝，或含有这一 DNA 片段的生物体的精确拷贝。

cloning vector 克隆载体

如质粒、病毒或人工染色体的 DNA 分子，它能容纳克隆用的外源 DNA 片段。

closed system 封闭系统

不能与周围环境交换物质的一种热力学系统。

coated pit 包被小窝

细胞表面的蛋白质包被位点，在那里受体-配体复合物被内吞。

coated vesicle 包被小泡

一种膜状的细胞内的转运小泡，它被笼状网格蛋白所包围。

coding strand 编码链

见 sense strand（有意义链）。

codon 密码子

DNA 或 RNA 中三个核苷酸的序列，它代表一种氨基酸。

coenzyme 辅酶

为酶催化活性所必需的有机小分子，辅酶可以是共底物或辅基。

cofactor 辅因子

为酶催化活性所需的有机小分子(辅酶)或金属离子。

coiled coil 卷曲螺旋

多肽链的两条 α 螺旋相互缠绕而形成的结构，如 α 角蛋白。

cointegrate 共联体

两个质粒融合的产物，作为转座作用中一个中间物出现。

colligative property 依数性

指一种物理性质，例如冰点降低或渗透压，它依赖于溶解物质的浓度，而不依赖于它的化学本性。

colony hybridization 集落杂交

将多个细胞集落的 DNA 转移到膜或滤膜上，然后和 DNA 或 RNA 探针一起保温，以检测细胞集落中目的 DNA 片段是否存在的一种过程。也称原位杂交。

compartmentation 区室化

将细胞分成较小的功能上无联系的体系。

competitive inhibition 竞争性抑制

酶抑制作用的一种形式，一种物质和底物竞争与酶活性中心的结合，从而使 K_M 值增加。

condensation reaction 缩合反应

失去水分子，两个分子之间形成一个共价键；水解反应的逆反应。

conjugate acid 共轭酸

当碱接受质子时形成的化合物。

conjugate base 共轭碱

当酸放出质子时形成的化合物。

conjugate redox pair 氧化还原共轭对

电子供体和电子受体形成的半反应。

conservative replication 保守性复制

DNA 复制的一种假设性模式。在此模式中，亲代分子保持完整，子代双链的二条链都是新合成的。

conservative substitution 保守性置换

蛋白质中的一个氨基酸残基被置换成一个性质与之类似的氨基酸残基,如亮氨酸被置换成异亮氨酸,或者天冬氨酸被换成谷氨酸。

constant region 恒定区

抗体(免疫球蛋白)亚基的 C 端部分,不表现出抗体的抗原识别(可变)区的高度序列可变性。

constitutive enzyme 组成型酶

以或高或低恒定速度合成的酶,为细胞基本功能所必需。也叫持家酶,参见 inducible enzyme(诱导酶)。

contact inhibition 接触抑制

培养的动物细胞因彼此接触引起的对细胞增殖的抑制。

contour length 恒值长度

一个完全伸展的多聚分子末端到末端相连的长度。

contour map 等高线图

包含线条(等高线)的图谱,这些线条勾出图谱的某些性质的等值点的位置(如海拔、电子密度)。

convergent evolution 趋同进化

无关种属或蛋白质的相似特性的独立发育。

cooperative binding 协同结合

一个配体结合到大分子上的一个位点后,可以影响其他位点和相同样配体的亲和性。既有正协同性,也有负协同性,参见 allosteric interactions(别构效应)。

corepressor 辅阻遏物

和蛋白质阻遏物共同起作用,阻断基因转录的小分子物质。

Cori cycle Cori 循环

一条代谢途径,在此途径中,肌肉中由糖酵解产生的乳酸,通过血液转运到肝脏,在那儿用于糖异生,产生的葡萄糖再回到肌肉中。

cosubstrate 共底物

一种辅酶,只是瞬时地和酶结合,起底物的作用。

coupled enzymatic reaction 偶联的酶促反应

一种实验技术。一个酶的活性可由加入的第二种酶利用第一个酶促反应的产物生成可以检测的产物而测定。

covalent catalysis 共价催化

一种催化机制;催化剂与反应物之间暂时形成共价键,以降低反应过渡态的自由能。

Crassulacean acid metabolism(CAM) 景天酸代谢

光合作用 C_4 循环的一种变体,CO_2 暂时以苹果酸形式储存。

Creutzfeldt-Jakob disease 克雅氏病

一种人类神经退行性疾病,与牛的海绵状脑病变相似。

cristae 嵴

线粒体内膜的内陷。

cross talk 交叉对话

不同的信号传导途径,通过对相同信号分子的激活,产生共同的第二信使,或者通过相似的靶蛋白磷酸化方式相互作用。

cryoelectron microscopy 冰冻电镜术

电子显微术的一种技术,样品被迅速冷冻到极低温度,和常规电子显微术相比,样品较高程度地保持着天然形状。

C-terminus C端

见 carboxyl terminus(羧基末端)。

curved arrow covention 弯形箭头规则

一种标记方法,从电子发射处画一个弯形箭头,指向吸引电子对的缺电子中心,从而标明化学反应中电子对的移动。

C-value paradox C值矛盾

有机体特有遗传物质的量(其C值)与其形态学和代谢复杂性相关这一规律的例外。

cyanosis 发绀

一种偏蓝的皮肤颜色,说明动脉血中存在脱氧血红蛋白。

cyclic symmetry 环状对称

对称的一种类型,其中对称体的不对称单位通过单轴旋转而关联。

cyclin 细胞周期素

参与调控细胞周期各阶段的蛋白质家族中的一个成员,其浓度在细胞周期进程中剧烈变化。

cytochrome 细胞色素

一种氧还活性蛋白,通过含铁血红素辅基传递电子。

cytoplasm 细胞质

细胞内除了核以外的所有组分。

cytoskeleton 细胞骨架

细胞内纤维网络结构,使细胞保持一定的形状和结构强度。

cytosol 细胞溶胶

细胞(细胞质)内除了核和膜包裹的细胞器以外的所有组分。

Da 道尔顿

分子质量的单位;是^{12}C原子质量的1/12。

dark reaction 暗反应

光合作用的一部分。由光反应产生的NADPH和ATP被用来将CO_2整合到糖中。

Darwinian evolution 达尔文进化

见 evolution(进化)。

ddNTP

任一双脱氧核苷三磷酸的缩写。

deamination 脱氨作用

水解去除氨基。

degenerate code 简并密码

一个以上的“词”编码同样的实体,这种密码称简并密码。

ΔΨ

见 membrane potential(膜电势)。

denature 变性

破坏多聚物的天然构象,使之完全去折叠,不再保持明显的二级结构。

deoxy sugar 脱氧糖

一个 OH 被 H 取代而生成的糖。

deoxynucleotide 脱氧核苷酸

见 deoxyribonucleotide(脱氧核糖核苷酸)。

deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸

见 DNA。

deoxyribonucleotide 脱氧核糖核苷酸

戊糖部分是 2′-脱氧核糖的核苷酸。也称脱氧核苷酸。

desensitization 脱敏作用

细胞或有机体通过对刺激应答的下降产生的对一种长期刺激的适应。

dextrorotatory 右旋

从观察者角度看,使平面偏振光平面顺时针方向旋转;与左旋相反。

diabetes mellitus 糖尿病

一种疾病,病人胰岛不能分泌足量的胰岛素(也叫 I 型、胰岛素依赖型或青少年发病型糖尿病)。或者机体对循环中的胰岛素不能产生有效的应答(II 型、非胰岛素依赖型或成年发病型糖尿病)。糖尿病的特征是血液中葡萄糖浓度升高。

dialysis 透析

比半透膜孔径小的溶剂分子和溶质自由地与大量透析液交换,较大的溶质分子被保留,从而改变溶解了较大分子的溶液组分。

diazatroph 固氮菌

一类可以固定 N_2 的细菌。

dideoxy method 双脱氧法

见 chain-termination procedure(链末端终止法)。

differential labeling 差示标记

用标记试剂处理大分子,标记试剂中具有或没有能和大分子结合的一种分子,以便确定大分子中与结合分子相互作用的部分。

diffraction pattern 衍射模式

被某一物体散射的放射线的破坏性及构建性干涉的记录。在 X-射线晶体衍射中,是从一单晶散射的一组平行 X 射线产生的一系列不连续的点。

diffusion 扩散

通过分子的随机运动而进行的分子转运。

diffusion-controlled limit 扩散控制极限

溶液中的酶促反应在理论上的最大速度,约 $10^8 \sim 10^9 (mol \cdot L^{-1})^{-1} \cdot S^{-1}$。

dihedral angle 二面角

见 torsion angle(扭角)。

dihedral symmetry 二面对称

一种对称类型。不对称单位通过二重旋转轴关联,该旋转轴与另一个旋转轴以直角相交。

dimmer 二聚体

由二个单体单位(原体)组成的复合物。

dinucleotide binding fold 二核苷酸结合折叠

由两个βαβαβ单位组成的蛋白质结构基元,可以与一个二核苷酸如 NAD^+ 结合,也称 Rossmann 折叠。

diphosphoryl(pyrophoshoryl)group 二磷酸(焦磷酸)基团

二个磷酸基团通过一个磷酸酐键 $(—O_3P—O—PO_3—)^{2-}$ 相连。

diploid 二倍体

有二套相等的染色体。

dipolar ion 偶极离子

见 zwitterion(兼性离子)。

disaccharide 二糖

由二个单糖通过糖苷键相连形成的糖。

dissociation constant, *K* 解离常数

达到平衡时,已解离分子的浓度与其亲母化合物浓度的比值。

disulfide bond 二硫键

共价—S—S—键。

DNA 脱氧核糖核酸

脱氧核苷酸的多聚体,其碱基序列编码所有细胞内的遗传信息。

dNTP 脱氧核糖核苷三磷酸

domain 结构域

一组由一个或多个多肽片段折叠而成的球状单位,每个片段由约 100～200 个氨基酸①残基组成。

double-displacement reaction 双置换反应

在反应的第一阶段结合了一个底物并释放一个产物,在第二阶段又结合另一个底物并释放另一个产物。

double-reciprocal plot 双倒数图

见 Lineweaver-Burk 作图。

ξ 还原电位

见 reduction potential(还原电位)。

Edman degradation Edman 降解

依次去除并鉴定多肽的 N 端残基的过程。

EF hand EF 手型

一种广泛存在的螺旋-环-螺旋结构基元,可以形成 Ca^{2+} 结合位点。

eicosanoids 类二十烷酸

从 C_{20} 脂肪酸花生四烯酸衍生而来的 C_{20} 化合物,起局部介质的作用。前列腺素、前列环素、

---

① 原文此处为 polypeptide,应为 amino acid。——译者注

凝血噁烷和白三烯都是类二十烷酸。

electrogenic transport 生电转运

带电荷物质跨膜运动的一种方式,在膜两侧产生电荷差异。

electromotive force, emf 电动势

$\Delta\xi$,参见 reduction potential(还原电位)。

electron crystallography 电子晶体学

测定分子结构的一种技术,利用电镜的电子束使感兴趣分子的二维晶体产生衍射。

electron-transport chain 电子传递链

一系列与膜结合的电子载体,将电子从还原型辅酶(NADH 和 $FADH_2$)传递到分子氧,从而回收能量,用于合成 ATP。

electrophile 亲电体

含有未满价电子层或含有电负性原子的基团,亲电体易于与亲核体发生反应。

electrophoresis 电泳

见 gel electrophoresis(凝胶电泳)。

electrostatic catalysis 静电催化

一种催化机制,催化位点的电荷分布降低了反应过渡态的自由能。

elementary reaction 基本反应

简单的一步化学过程,在一个化学反应中,几个这样的过程可能依次发生。

ELISA

见 enzyme-linked immunosorbent assay(酶联免疫吸附测定)。

elongation factor 延伸因子

在多肽合成时与 tRNA 和或核糖体相互作用的一种蛋白质。

eluant 洗脱液

用来洗脱层析柱的溶液。

elution 洗脱

使结合在层析介质上的分子解离下来的过程。

emf 电动势

参见 reduction potential(还原电位)。

enantiomers 对映体

相互不能重叠的镜像分子。对映体是一类立体异构体。

endergonic process 吸能过程

总的自由能变化是正值的过程(非自发过程)。

endocrine gland 内分泌腺

在高等动物中合成并释放激素进入血液的组织。

endoglycosidase 内切糖苷酶

催化多糖内二个单糖单位之间的糖苷键水解的酶。

endonuclease 内切核酸酶

催化多核苷酸链中二个核苷酸残基之间的磷酸二酯键水解的酶。

endopeptidase 内肽酶

催化多肽链内肽键水解的酶。

endoplasmic reticulum, ER　内质网

真核细胞中一种复杂的有膜细胞器,膜脂在其中合成,某些蛋白质在其中进行翻译后加工。

endosome　内体

一种和膜结合的囊泡,接受细胞通过受体介导的胞吞作用摄取的物质,并将其转运到溶酶体中去降解。

energy coupling　能量偶联

电子传递产生的自由能以 ADP + P_i 合成 ATP 的形式保存。

"energy-rich" compound　"富含能量"的化合物

见"high-energy"compound　("高能"化合物)。

enhancer　增强子

一种真核细胞 DNA 序列,距转录起始位点一定距离,转录的活化因子可能与之结合。

enthalpy, *H*　焓

一种热力学量,$H = U + PV$,在恒压下(q_p)与吸收的热量相等。

entropy, *S*　熵

对体系的随机度和混乱度的测量。熵被定义为 $S = k_B \ln W$, k_B 是 Boltzmann 常数, W 是体系达到某一特定状态可能具有的途径数目。

enzyme　酶

一种生物催化剂。大多数酶是蛋白质;少数是 RNA。

enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA　酶联免疫吸附测定

检测某种分子的方法,有时可用于定量测定。该分子与其抗体结合,在抗体上又结合一个酶,和易于检测的反应产物。

epimers　差向异构体

只有一个 C 原子构型不同的糖(除异头体碳原子外)。

equatorial substituent　赤道取代基

大部分伸展在它所键合的环平面内的基团;与垂直取代基相反。

equilibrium　平衡

在一个过程中,正反应和逆反应速度恰好平衡的那一点,因此达到平衡点时,反应不再有净变化。

equilibrium constant, K_{eq}　平衡常数

达到平衡时,反应产物的浓度与反应物浓度的比值。K_{eq} 与反应的 ΔG^0 相关: $\Delta G^0 = -RT\ln K_{eq}$,通常缩写为 K。

equililrium density gradient centrifugation　平衡密度梯度离心

一种实验技术。将不同分子的混合物置于一种含有稠密的、快速扩散的物质,如 CsCl 的浓溶液中,进行超离心,CsCl 在离心时形成密度梯度,当离心达到平衡时,混合物可按其组分分子的密度而得以分开。

ER　内质网

见 endoplasmic reticulurn(内质网)。

erythrocyte　红细胞

红血球，其功能是将 O_2 转运到组织中，实际上是由膜包围的一袋血红蛋白。

erythrocyte ghost 红细胞血影

从红细胞衍生而来的有膜颗粒，保留了其本来的形状，但没有细胞质。

essential amino acid 必需氨基酸

动物体不能合成、必须从食物中获得的氨基酸。

essential fatty acid 必需脂肪酸

动物体不能合成、必须从食物中获得的脂肪酸。

ester group 酯基

分子中化学式为—COOR 的一部分，R 是烷基。

ether 醚

化学式为 ROR′的分子，R 和 R′均为烷基。

Eubacteria 真细菌

两类主要的原核生物之一(另一类是古细菌)。

euchromatin 常染色质

真核细胞中有转录活性的、相对未被压缩的染色质。

eukarya 真核生物

见 eukaryote(真核生物)。

eukaryote 真核生物

由单个细胞(或多细胞)组成的有机体，其遗传物质包含在一个由膜包围的核内。

evolution 进化

一个有机体或其组分之一，由于遗传物质的改变而产生的渐近变化，这种遗传物质的变化可以从父母传给子女。

exciton transfer 激子转移

能量激发分子衰变的一种方式，电子能量被转移给邻近的未被激发的分子。也称共振能量转移。

exergonic process 放能过程

总的自由能改变为负值的过程(自发进行的过程)。

exoglycosidase 外切糖苷酶

催化从多糖末端水解切下单糖单位的酶。

exon 外显子

在原初的和成熟的 mRNA 转录本中都出现的基因部分，也称表达序列。

exonuclease 外切核酸酶

从多核苷酸链的末端催化水解切下核苷酸残基的酶。

exopeptidase 外肽酶

从多肽链的一端催化水解切下氨基酸残基的酶。

expression vector 表达载体

包含在宿主细胞中产生外源 DNA 基因产物(RNA 或蛋白质)所需要的转录和翻译控制序列的质粒。

extrinsic protein 外在蛋白

见 peripheral protein(外周蛋白)。

Fab fragment Fab 片段

抗体分子中含有抗原结合位点的蛋白酶酶解片段。见 Fe 片段。

facilitated diffusion 易化扩散(促进扩散)

见 passive-mediated transport(被动转运)。

familial hypercholesterolemia 家族性高胆固醇血症

见 hypercholesterolemia(高胆固醇血症)。

fat 脂

在室温下呈固态的甘油三酯的混合物。

fatty acid 脂肪酸

带有长的碳氢侧链的羧酸。

Fc fragment Fc 片段

抗体分子中含有两条重链 C 端部分的蛋白酶水解片段。

feedback inhibition 反馈抑制

在一顺序反应中,较后反应步骤的产物抑制早期的反应步骤。

feed-forward activation 前馈活化

在一个反应过程中,前面的反应步骤的产物激活后面的反应步骤。

fermentation 发酵

一种厌氧降解代谢过程。

Fe-S cluster Fe-S 簇

见 iron-sulfur cluster(铁-硫簇)。

fibrous protein 纤维状蛋白

具有刚硬、伸展构象的蛋白质,易形成纤维。

first-order reaction 一级反应

反应速度与单底物的浓度成正比的反应。

Fischer convention Fischer 规则

将手性分子的结构与 D-或 L-甘油醛的结构相比较,从而指认手性分子构型的一种体系。

Fischer projection Fischer 投影式

详细说明分子构型的一种图示法,水平线代表伸出纸平面之上的键,垂直线代表伸出纸平面之下的键。

5′end 5′端

多核苷酸的一端,其 C5′不与其他核苷酸残基生成酯。

flipase 翻转酶

催化膜脂跨脂双层转位(翻转)的酶。

flip-flop 翻转

见 transverse diffusion(横向扩散)。

fluid mosaic model 液态镶嵌模型

生物膜的一种模型。整合的膜蛋白漂浮在液态的脂双层中,并可在其中横向扩散。

fluorescence 荧光

受激发分子衰变的一种方式，电子能量以光子的形式发射。

fluorescence photobleaching recovery 荧光漂白恢复

根据荧光标记组分进入预先被激光脉冲漂白区域的速度，来测定膜组分扩散的一种技术。

fluorophore 荧光团

荧光基团。

flux 流量

(1)代谢物通过代谢途径的流速。(2)单位区域的转运速度。

footprinting 足迹法

通过测定被蛋白质保护，而不被化学试剂或酶学方法修饰的碱基，用以鉴定与蛋白质结合的DNA序列。

fractional saturation, Y 分级饱和度

一个蛋白质的配体结合位点被配体占据的比例。

fractional procedure 分级分离

根据混合物中各组分的化学和物理性质的不同而达到分离目的的一种实验技术。

frameshift mutation 移码突变

在DNA中插入或缺失核苷酸，导致翻译时改变了三核苷酸密码（密码子）的序列读框。

free energy, *G* 自由能

一种热力学量，$G = H - TS$，在恒压下自由能的变化反映了一个过程能否自发进行。可以自发进行的过程，$\Delta G < 0$；一个反应达到平衡时，$\Delta G = 0$。也称Gibbs自由能。

free energy of activation, $\Delta G^{\ddagger}$ 活化能

在化学反应中，过渡态的自由能减去反应物的自由能。

free radical 自由基

带有未配对电子的分子。

freeze-etching 冰冻蚀刻

一种复杂的冰冻断裂电子显微技术，通过升华去除冰，从而暴露另一个膜表面。

freeze-fracture electron microscopy 冷冻断裂电子显微术

用于观察膜内部的一种技术，将冷冻的膜破碎使之在脂双层的二层之间裂开。

functional group 功能基团

分子中参与和其他物质相互作用的部分。生物化学中常见的功能基团是：酰基、酰胺基、氨基、羰基、羧基、二磷酸基（焦磷酸基）、酯基、醚基、羟基、吲哚基、磷酸基和巯基。

furanose 呋喃糖

具有五元环的糖。

futile cycle 无效循环

见 substrate cycle（底物循环）。

G 自由能

见 free energy（自由能）。

$G^{\ddagger}$ 过渡态自由能

过渡态自由能，参见 free energy of activation（活化能）。

G-protein G蛋白

涉及信号传导过程的一种鸟嘌呤核苷酸结合蛋白,当它与 GDP 结合时没有活性,与 GTP 结合时有活性。G 蛋白的 GTPase 活性限制了其自身的活性。G 蛋白异三聚体是由三个亚基组成的,活化时解离形成 G_{α}(GTP 可与之结合)和 $G_{\beta\gamma}$复合物。

ganglioside 神经节苷脂

神经酰胺的头部基团至少含有一个唾液酸残基的寡糖。

gap gene 缺口基因

见 segmentation genes(节段化基因)。

gastrulation 原肠胚形成

胚胎发育的一个阶段,细胞迁移形成一个三层结构。

gel electrophoresis 凝胶电泳

大分子在外加电场的影响下,通过凝胶样的基质时,因所带电荷和分子大小的差异,迁移率不同而被分开,这个过程即凝胶电泳。在聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)中,基质是交联的聚丙烯酰胺。琼脂糖电泳用于分离分子质量较大的分子,如 DNA。参见 SDS-PAGE。

gel filtration chromatography 凝胶过滤层析

根据分子的大小和形状分离大分子的过程。也称分子排阻或分子筛层析。

gene 基因

编码多肽或 RNA 的核苷酸序列,它可能包括起调节作用的非转录和非翻译序列。

gene duplication 基因重复

导致在同一套染色体中出现一个基因的两个拷贝的事件,如通过异常交换。每个拷贝都可以独立进化。

gene expression 基因表达

通过转录和翻译,解码包含在基因中的信息,产生有功能的 RNA 或蛋白质产物。

gene knockout 基因剔除

使动物中某一特定基因缺失,或失活的基因工程技术。

gene product 基因产物

基因编码的 RNA 或蛋白质,是基因通过转录和翻译进行表达的终点。

gene therapy 基因治疗

将遗传物质转移到个体的细胞中,以产生治疗效果。

general acid catalysis 广义酸催化

一种催化机制,从一种酸转移部分质子,降低反应过渡态的自由能。

general base catalysis 广义碱催化

一种催化机制,一种碱吸引部分质子,降低反应过渡态的自由能。

general transcription factor, GTF 通用转录因子

合成所有 mRNA 所需的一组真核生物蛋白质之一。

genetic code 遗传密码

核酸中核苷酸序列与多肽中氨基酸顺序之间的对应关系;一系列的三核苷酸(密码子)分别决定一种氨基酸。

genetic engineering 基因工程

见 recombinant DNA technology(重组 DNA 技术)。

genetic recombination 基因重组

见 recombination(重组)。

genome 基因组

有机体中的全套遗传指令。

genomic imprinting 基因组印记

父系和母系基因在子代中的差异表达,是这些基因不同的甲基化模式所致。

genomic library 基因组文库

代表有机体完整基因组的一套克隆的 DNA 片段。

genomics 基因组学

研究有机体的基因组的大小、组织和基因组成。

genotype 基因型

有机体的遗传特征。

Gibbs free energy Gibbs 自由能

见 free energy(自由能)。

globin 珠蛋白

肌红蛋白和血红蛋白的多肽组分。

globoside 红细胞糖苷脂

一种神经酰胺,其头部基团是一中性寡糖。

globular protein 球形蛋白

以紧密的、具有高度折叠结构为特征的水溶性蛋白质。

glucogenic amino acid 生糖氨基酸

降解产生糖异生前体的氨基酸。见 ketogenic amino acid(生酮氨基酸)。

gluconeogenesis 糖异生

从非糖前体合成葡萄糖。

glucose-alanine cycle 葡萄糖-丙氨酸循环

一条代谢途径,肌肉中糖酵解产生的丙酮酸被转化为丙氨酸,并转运到肝脏,在那儿重新转化为丙酮酸,进行糖异生,产生的葡萄糖再回到肌肉。

glycan 聚糖

见 polysaccharide(多糖)。

glycerophospholipid 甘油磷脂

一种两亲性脂,分子中两个脂酰基连在甘油-3-磷酸上,甘油-3-磷酸的磷酸基团则与一极性基团相连。

glycoconjugate 复合糖

诸如糖脂或糖蛋白这类分子,含有共价连接的糖。

glycoforms 糖型

只是共价相连的糖的序列、位置和数目不同的糖蛋白。

glycogen 糖原

由 α(1→4)糖苷键连接的葡萄糖残基组成的多聚体,带有 α(1→6)糖苷键形成的分支,在动物体中作为葡萄糖的储存分子。

glycogen storage disease 糖原储积病

一种糖原代谢遗传病,影响到糖原分子的大小和结构、或者在肌肉和/或肝脏中的转移。

glycogenolysis 糖原分解

糖原被酶促降解为葡萄糖-6-磷酸。

glycolipid 糖脂

和糖共价相连的脂。

glycolysis 糖酵解

由 10 步反应组成的代谢途径,通过这一途径,葡萄糖被降解为 2 分子丙酮酸,同时产生 2 分子 ATP,并将 2 分子 NAD^+ 还原为 2 分子 NADH。

glycoprotein 糖蛋白

和糖共价相连的蛋白质。

glycosaminoglycan 糖胺聚糖

由糖醛酸和己糖胺残基交替组成的不分支多糖。

glycosidic bond 糖苷键

糖分子的异头体碳原子与一个醇基(*O*-糖苷键)或一个氨基(*N*-糖苷键)之间形成的共价连接(缩醛或缩酮)。

glycosylation 糖基化

糖链通过 *N*-或 *O*-糖苷键与蛋白质相连。

glyoxylate pathway 乙醛酸循环

柠檬酸循环在植物中的一条变异途径,使乙酰 CoA 定量地转化为糖异生前体。

glyoxysome 乙醛酸循环体

由膜包围的植物细胞器,乙醛酸循环反应在其中进行,是过氧化物酶体的特殊类型。

Golgi apparatus 高尔基体

由一系列扁平的膜囊组成的真核细胞器,新合成的蛋白质和脂在其中被修饰。

gout 痛风

一种疾病,特征是尿酸浓度升高,通常是尿酸排泄受损的结果,它最常见的症状是由于尿酸钠累积而引起的疼痛性关节炎。

Gram-negative bacterium 革兰氏阴性菌

不能被革兰氏染料染色的细菌,说明其细胞壁被一层复杂的外膜包围,这层外膜排斥革兰氏染料。

Gram-positive bacterium 革兰氏阳性菌

可以被革兰氏染料染色的细菌,说明其最外层是细胞壁。

grana(单数是 **granum**) 基粒

叶绿体中的类囊体堆积盘。

growth factor 生长因子

刺激靶细胞增殖和分化的蛋白质激素。

GTF 通用转录因子

见 general transcription factor(通用转录因子)。

H 焓

见 enthalpy(焓)。

half-reaction 半反应

单个的氧化或还原过程,涉及一个电子供体和其共轭的电子受体。发生在电池中,但需要与另一个这样的反应直接接触,形成一个完整的氧化-还原反应。被称为氧还对。

half-life 半寿期

见 half-time(半衰期)。

half-time($t_{1/2}$) 半衰期

起始反应物的一半进行反应所需的时间,也称半寿期。

halophile 嗜盐生物

可以(以及可能需要)在高盐环境中生长的有机体。

haploid 单倍体

有一套染色体。

Haworth projection Haworth 投影式

糖环的一种表示方法,伸出在纸平面前的环键画成粗黑线,伸到纸平面后面的环键画成细线。

heat shock protein, Hsp 热激蛋白

见 molecular chaperone(分子伴侣)。

helicase 解旋酶

解旋 DNA,产生正超螺旋的酶。

helix cap 螺旋帽

一种蛋白质结构元件,在螺旋之前或之后的一个残基侧链折回去,与螺旋的 4 个末端残基之一的骨架形成氢键。

helix-turn-helix (HTH) motif 螺旋-转角-螺旋基序

大约 20 个残基的蛋白质结构片段,由夹角为约 120°的两个螺旋构成。该基元出现于多个原核 DNA-结合蛋白中。

hemiacetal 半缩醛

醇与醛羰基的反应产物。

hemiketal 半缩酮

醇与酮羰基的反应产物。

hemolytic anemia 溶血性贫血

血流中的红细胞由于裂解(破裂)而损失。

Henderson-Hasselbalch equation Henderson-Hasselbalch 方程

弱酸溶液的 pH 与其 pK 关系的数学表述:$pH = pK + \lg([A^-]/[HA])$。

heterochromatin 异染色质

高度浓缩的非表达真核 DNA。

heterogeneous nuclear RNA (hnRNA) 核异质 RNA

初始的真核 mRNA 转录物,其内含子尚未被切除,亦称前 mRNA。

heterologous DNA 异质 DNA

重组过程中由不完全互补链组成的 DNA 区段。

heterolytic cleavage 异裂

化学成键的两个原子之一同时获得成键的两个电子，产生键的断裂。

heteropolysaccharide 杂多糖

由不止一种单糖组成的多糖。

heterotrimeric G-protein 异三聚体 G 蛋白

见 G 蛋白。

heterotroph 异养生物

通过氧化其他生物所产生的有机物来获取自由能的生物。

heterozygous 杂合的

两个变种基因各有一个。

hexose monophosphate shunt 己糖单磷酸旁路

见 pentose phosphate pathway(戊糖磷酸路径)。

"high-energy"compound 高能化合物

指降解反应高度放能的物质(其反应产生的自由能，至少满足标准生化条件下由 ADP 合成 ATP 的需要：$ADP + P_i \rightarrow ATP \geq 30.5\ kJ.mol^{-1}$)，亦称富能化合物。

high-performance liquid chromatography (HPLC) 高效液相色谱

应用精确制造的基质材料和精确混合溶剂的高压流动来分离分子的自动化方法。

Hill constant Hill 常数

Hill 方程的指数，衡量配体对分子协同性结合的程度。

Hill equation Hill 方程

一种数学表达式，表述配体结合分子的饱和程度，为配体浓度的函数。

histones 组蛋白

核小体中高度保守的碱性蛋白质，它与 DNA 结合构成核小体的核。

HIV

人免疫缺陷病毒，导致获得性免疫缺陷综合征(AIDS)。

hnRNA

见 heterogeneous nuclear RNA(核异质 RNA)。

Holliday junction Holliday 连接体

DNA 重组中作为中间体的四股结构。

holoenzyme 全酶

一种具有催化活性的酶-辅因子复合物。

homeobox 同源框

见 homeodomain(同源结构域)。

homeodomain 同源结构域

约 60 个氨基酸大小的 DNA 结合基元，是许多决定胚胎细胞特征和状态的基因共有结构，这类基因编码转录因子，亦称同源框。

homeostasis 稳态(体内稳定)

维持有机体内的稳定态。

homeotic selector genes 同源异型选择者基因

决定身体节段特征的昆虫基因。

homolactic fermentation 同源乳酸发酵

丙酮酸还原为乳酸,并伴随 NADH 氧化为 NAD^+。

homology 同源性

两个实体的进化关系。

homology modeling 同源模建

由相似(同源)序列的多肽结构推导出三维结构的技术。

homolytic cleavage 同源断裂

化学成键的两个原子各获得成键的一个电子,导致键的断裂。

homopolysaccharide 同多糖

由同一种单糖组成的多糖。

homozygous 纯合的

具有两个相同拷贝的特定基因。

hormone 激素

从一种组织分泌到血流中,并引起其他组织生理反应(如生长、代谢)的物质(如肽或类固醇)。

hormone response element 激素应答元件

类固醇激素与受体复合物结合的 DNA 序列,该结合增强或抑制相关基因的转录。

hot spot 热点

具有异常高的点突变频率的 DNA 位点。

housekeeping enzyme 持家酶

见 constitutive enzyme(组成酶)。

HPLC 高效液相层析

见 high-performance liquid chromatography(高效液相层析)。

HSP 热激蛋白

见 molecular chaperone(分子伴侣)。

HTH motif

见 helix-turn-helix motif(螺旋-转角-螺旋基序)。

humoral immunity 体液免疫

由 B 淋巴细胞产生的抗体(免疫球蛋白)调节的免疫。

hybridization 杂交

指互补 DNA 和(或)RNA 序列形成双键片段。

hybridoma 杂交瘤

通过将产生抗体的淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合而形成的细胞克隆。这些细胞产生单克隆抗体。

hydration 水合作用

指被多层溶剂水分子包围并与之作用的分子状态,即被水溶剂化。

hydrogen bond 氢键

弱酸供体基团如 O—H 或 N—H 与弱碱受体原子如 O 或 N 之间的主要静电相互作用。

hydrolase 水解酶

催化水解反应的酶。

hydrolysis 水解作用

通过加入水分子实现的共价键的断裂。缩合反应的逆过程。

hydronium ion 水合氢离子

结合在水分子上的质子,H_3O^+。

hydropathy 亲水度

氨基酸残基亲水性与疏水性的综合衡量,指出蛋白质内部发现该残基的可能性。

hydrophilic substance 亲水物质

某种物质的高极性使之极易与水分子发生反应而溶于水。 .

hydrophobic collapse 疏水折拢

指蛋白质折叠的一种驱动力,来自于疏水残基避开与水分子的接触而形成蛋白质内核的倾向。

hydrophobic effect 疏水效应

指水分子最大程度地减小与非极性物质的接触,从而引起物质聚集的倾向。

hydrophobic interaction chromatography 疏水层析

一种利用分子所具有的疏水性而被选择性地保留在非极性基质上的方法。

hydrophobic substance 疏水物质

指由于非极性性质而减小了其溶于水的能力的物质,疏水物质趋向溶于非极性溶剂而不溶于水。

hydroxyl group 羟基

分子的—OH 部分。

hyperammonemia 高氨血症

血液中氨水平升高,一种中毒情形。

hypercholesterolemia 高胆固醇血症

血液中胆固醇水平高,是导致心脏疾病的危险因素。家族性高胆固醇血症通常是由 LDL 受体的遗传缺陷导致的。

hyperglycemia 高血糖

血液中葡萄糖水平升高。

hypervariable residue 高变残基

蛋白质中某个氨基酸残基,其在进化相关蛋白质中所处位置被许多其他不同的残基占据。

hypoxia 低氧

血氧水平低于正常值的状态。

I-cell disease I 细胞缺陷

溶酶体水解酶的遗传缺陷,导致黏多糖和糖脂包含物在溶酶体中的积累。

Ig 免疫球蛋白

见 antibody(抗体)。

imaginal disk 成虫盘

昆虫幼虫的一片表观上未分化,但已进行发育的细胞,最终成为成虫的特定外部结构。

imino group 亚氨基

分子中的 >C═NH 部分。

immunoaffinity chromatography 免疫亲和层析

利用分子特异性地结合在固定化抗体上的性质，将分子从混合物中分离出来的方法。

immunoassay 免疫测定

利用与大分子特异性作用的抗体或抗体混合物检测、有时用于定量测定该分子活性的方法。

immunoblot 免疫印迹

利用分子结合抗体的性质来检测该分子的技术，分子固定在滤膜上。Western blot 是检测电泳后固定化蛋白质的免疫印迹。

immunofluorescence microscopy 免疫荧光显微镜

荧光标记的抗体，被用于检测其结合的抗原是否存在的显微技术。

immunoglobulin (Ig) 免疫球蛋白

见 antibody(抗体)。

immunoglobulin fold 免疫球蛋白折叠

抗体分子中由二硫键连接的结构域，它包含由一个三股和一个四股反平行片层夹成的三明治结构。

in situ 原位

***in situ* hybridization** 原位杂交

见 colony hybridization(集落杂交)。

in vitro 体外，在实验室(文献中指在试管里)，在体外。

in vivo 体内，在活机体内。

inactivator 灭活剂

与酶不可逆结合的抑制剂。

indirect readout 非直接读出

DNA 结合蛋白不通过与碱基直接作用、而通过序列依赖性构象和/或 DNA 骨架柔性来探测其靶序列的能力。

induced fit 诱导楔合

蛋白质与其配体间的一种相互作用，它能引起蛋白质构象的变化，以增强蛋白质对配体的亲和性。

inducer 诱导物

促进基因表达的物质。

inducible enzyme 诱导酶

仅当细胞需要的时候才合成的酶，见 constitutine enzyme(组成酶)。

inhibitor 抑制剂

通过影响酶的底物结合或转换数来降低酶活性的物质。

initiation factor 起始因子

与 mRNA 和(或)核糖体作用的蛋白质，为起始翻译所必需。

inorganic compound 无机化合物

不含碳元素的化合物。

insertion sequence 插入序列

两侧被短的反向重复序列框定的简单转座子，亦称 IS 元件。

insulin resistance 胰岛素抗性

通过增加葡萄糖摄入而使细胞不能对胰岛素产生响应。

integral protein 整合蛋白

埋在脂双层中的膜蛋白，只能用破坏膜的试剂处理才能从膜中分离出来。亦称内在蛋白。

intercalation agent 嵌入剂

滑入寡核苷酸堆积碱基之间的平面芳香阳离子。

interconvertible enzyme 互变酶

进行磷酸化和去磷酸化以调节其活性的蛋白质。

interfacial activation 界面活化

当脂类特异性酶接触脂-水界面时活性增强。

intermembrane space 膜间间隙

线粒体膜内层和外层之间的空间。由于外层膜的多孔性，膜间间隙的小分子成分与细胞溶胶相同。

internal conversion 内转换

激发分子的一种衰减模式，其中电子能量转化为热（分子运动的动力学能量）。

intervening sequence 间插序列

见 intron（内含子）。

intrinsic protein 内在蛋白

见 integral protein（整合蛋白）。

intron 内含子

基因的一部分，被转录，但在翻译前被切除。亦称间插序列。

invariant residue 不变残基

所有进化相关蛋白质中都相同的残基。与之相反的是高变残基。

ion exchange chromatography 离子交换层析

一种分离方法，分子选择性地保留在带相反电荷的基质上。

ion pair 离子对

两个带相反电荷的离子基团之间的静电作用。在蛋白质中，也称为盐桥。

ionophore 离子载体

增强膜对特定离子渗透性的有机分子，常为抗生素。

iron-sulfur cluster 铁硫簇

一种辅基，最常由相等数目的铁离子和硫离子（即[2Fe-2S]和[4Fe-4S]）组成，通常参与氧化-还原反应。

IS element IS 元件

见 insertion sequence（插入序列）。

isoaccepting tRNA 同工 tRNA

运载相同氨基酸但反密码子不同的 tRNA。

isoelectric point (p*I*) 等电点

分子净电荷为零时的 pH 值。

isolated system 隔离系统

与环境无物质和能量交换的热力学系统。

isomerase 异构酶

催化异构化反应的酶。

isopeptide bond 异肽键

氨基酸 α-羧基与赖氨酸的 ε-氨基之间的酰胺连接,或氨基酸的 α-氨基与天冬氨酸、谷氨酸的 β-、γ-羧基之间的酰胺连接。

isoschizomers 同切点酶

切点在相同核苷酸序列上的两个限制性内切核酸酶。

isozymes 同工酶

由不同基因编码催化相同反应的酶。

jaundice 黄疸

由组织中血红素降解产物胆红素沉积导致的皮肤和眼白发黄。是肝功能异常、胆管阻塞或红细胞高速破坏的症状。

junk DNA 无用 DNA

见 selfish DNA(自在 DNA)。

K 解离常数或平衡常数

k 见 dissociation constant(解离常数)和 equilibrium constant(平衡常数)。

见 rate constant(速率常数)。

kb 千碱基对

1 kb = 1000 碱基对(bp)。

k_{cat} 酶转换数

酶反应的催化常数,等于最大反应速度(V_{max})与酶浓度($[E]_T$)的比值。亦称转换数。

kDa 1000 道尔顿(Da)

K_{eq} 平衡常数

见 equilibrium constant(平衡常数)。

ketogenesis 生酮作用

由乙酰辅酶 A 进行酮体合成。

ketogenetic amino acid 生酮氨基酸

在动物中降解的产物,可转变为脂肪酸或酮体、但不转化为葡萄糖的氨基酸,见 glucogenic aminoacid(生糖氨基酸)。

ketone bodies 酮体

肝中由乙酰辅酶 A 合成的乙酰乙酸、D-β-羟丁酸和丙酮,在外周组织缺少葡萄糖时可用作代谢燃料。

ketose 酮糖

羰基是酮的糖类。

ketosis 酮病

酮体产生过量的病理状况。

kinase 激酶

在 ATP 与另一分子之间传送磷酰基的酶。

kinetic proofreading 动力学校正

非关连 tRNA 以高于 EF-T·GDP 分解的速率从核糖体解离，从而提高翻译准确性的过程。

K_M

见 Michaelis constant(Michaelis 常数)。

Krebs cycle Krebs 循环

见 citric acid cycle(柠檬酸循环)。

K_w 水离子化常数

水的离子化常数，等于 $10^{-14}(mol \cdot L^{-1})^2$。

L 连接数

见 linking number(连接数)。

lactose intolerance 乳糖不耐性

因缺乏 β-半乳糖苷酶(乳糖酶)而不能消化乳糖。

lagging strand 后随链

其模板链沿复制叉运动方向由 5′至 3′延伸的 DNA 链，该链先合成一系列不连续片段，然后连接起来。

lateral diffusion 侧向扩散

脂类在双层膜的单层中的运动。

leader peptide 前导肽

见 signal peptide(信号肽)。

leader sequence 前导序列

(1)操纵子第一个基因上游的一段核苷酸序列，它的翻译决定了整个操纵子的转录，见 attenuation(衰减作用)。

(2) 多肽的 N 端序列，常常不作为成熟蛋白质的一部分，与蛋白质进入或穿过膜有关。

leading strand 先导链

其模板链沿复制叉运动方向由 3′至 5′延伸的 DNA 链，该链是连续合成的。

lectin 凝集素

结合特定糖类的蛋白质。

Lesch-Nyhan syndrome Lesch-Nyhan 综合征

由于缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶引起的遗传病，该酶为嘌呤补救反应所需。病人产生过量尿酸并表现出神经异常。

leucine zipper 亮氨酸拉链

一种蛋白质结构基元，其中两个 α 螺旋结合成超螺旋螺旋，各螺旋沿一侧有一条疏水带。这个基元中约每 7 个残基出现一个亮氨酸，调节多种 DNA 结合蛋白的相互联合。

leukocyte 白细胞

血液白细胞。

levorotatory 左旋性

从观测者角度看，偏振光平面逆时针旋转。与右旋性相反。

ligand 配体

(1)与大分子结合的小分子。(2)结合在金属离子上的分子或离子。

ligase 连接酶

和 ATP 水解偶联、催化键形成的酶。

ligation 连接反应

将两个分子如两个 DNA 片段连接在一起。

light reactions 光反应

光合作用中的光合成部分，其中特定色素分子获得光能而被氧化。电子传递产生 NADPH 和跨膜质子梯度，促进 ATP 合成。

limited proteolysis 有限蛋白酶解

一种蛋白酶不完全消化多肽的技术。

Lineweaver-Burk plot Linweaver-Burk 曲线

将 Michaelis-Menten 方程变为另一形式，使得 K_M 和 V_{max}从直线获得。亦称双倒数曲线。

linker DNA 连接区 DNA

染色质中连接核小体核心粒子的约 55bp 的 DNA 片段。

linking number(*L*) 连接数

共价闭环的双链 DNA 中，一股与另一股之间交叉的次数，只有破坏共价键才能改变连接次数。

lipid 脂质

一大类主要或完全疏水的生物分子，不溶于水而溶于有机溶剂，如己烷。

lipid bilayer 脂双层膜

见 bilayer(双分子层)。

lipid-linked protein 脂连蛋白

通过与自己共价相连的脂如法尼基、牻牛儿基、豆蔻酰基、棕榈酰基、糖基磷脂酰肌醇基嵌入生物膜的蛋白质。

lipoprotein 脂蛋白

非极性脂核心外包一层双亲性蛋白质、磷脂和胆固醇壳组成的球形粒子。脂蛋白通过血流在组织之间传输脂类。

liposome 脂质体

双层脂膜包裹的小泡。

London dispersion forces London 分散力

电中性分子接近时相互之间的弱吸引力由涨落的偶极子之间静电作用所产生。

lung surfactant 肺表面活性剂

两亲性蛋白质和脂的混合物，防止呼吸时肺泡(微小气泡)萎陷。

Lyase 裂合酶

催化基团移去、产生双键的酶。

lymphocyte 淋巴细胞

免疫系统的细胞。

lysogen 溶原体

染色体中携带有插入噬菌体 DNA 的细菌。

lysogenic growth 溶原性生长

噬菌体的部分生活周期,其间,插入宿主染色体的 DNA 被动地与宿主 DNA 一起复制。

lysosome 溶酶体

真核细胞内的一种膜包裹的细胞器,含有一组水解酶,具有消化摄取的物质,和再生细胞成分的功能。

lytic growth 裂解生长

噬菌体的部分生活周期,其间,其 DNA 被表达而产生新的噬菌体,导致宿主细胞的溶解。

main chain 主链

见 backbone(骨架)。

major groove 大沟

DNA 双螺旋上的凹槽,碱基对的糖苷键对凹槽形成大于 180°的角。对于 B-DNA,这个沟比小沟宽。

malaria 疟疾

一种蚊传染的疾病,由原生动物恶性疟原虫引起,它生活的大部分周期是寄宿于血液中。

malignant tumor 恶性肿瘤

一团增生失控的细胞,癌。

maternal-effect gene 母系效应基因

其 mRNA 或蛋白质产物由母体存放在卵子中的昆虫基因,决定胚胎极性。

matrix 基质

线粒体内部的酶、底物、辅因子和离子胶状溶液。

mechanism-based inhibitor 机理型抑制剂

仅当进行部分或全部正常的催化反应后,才使酶化学失活的分子。亦称自杀底物。

mediated transport 介导性传输

物质通过特异性运载蛋白介导的跨膜运动,与非介导性传输相反。

melting temperature T_m 解链温度

大分子热变性融解曲线的中点温度。

membrane potential (Δψ) 膜电位

跨膜的膜电位差。

memory B cell 记忆 B 细胞

在遇到抗原后几周至数年的时间内,能识别其相应抗原,并迅速增殖产生特异性抗体的 B 细胞。

mercaptan 硫醇

含—SH 基的化合物。

messenger RNA (mRNA) 信使 RNA

序列与蛋白质编码基因 DNA 互补的核糖核酸。在核糖体中,mRNA 指导氨基酸聚合,形成相应序列的多肽。

metabolic fuel 代谢燃料

可氧化为有机体提供自由能的分子。

metabolism 代谢

指全部降解和生物合成的细胞反应。

metabolite 代谢物

代谢反应的反应物、中间物或产物。

metabolon 代谢区室

代谢途径中的酶在细胞质或细胞器中某一区域的松散联合。

metal ion catalysis 金属离子催化

需金属离子的存在,来降低反应过渡态自由能的催化机制。

metal-activated enzyme 金属活化酶

松散结合一个金属离子的酶,典型的有 Na^+、K^+、Mg^{2+} 或 Ca^{2+}。

metalloenzyme 金属酶

含有一个紧密结合金属离子辅因子的酶,典型的过渡金属离子如 Fe^{2+}、Zn^{2+}、Mn^{2+}。

methanogen 产甲烷菌

产生 CH_4 的有机体。

micelle 微团

两亲性分子在水溶液中的球状聚集物,极性片段形成表面,非极性成分构成不与溶剂接触的核。

michaelis constant (K_M) Michaelis 常数

对于遵循 Michaelis-Menten 模型的酶,$K_M=(k_{-1}+k_2)/k_1$;K_M 等于达到最大反应速度一半时的底物浓度。

Michaelis-Menten equation Michaelis-Menten 方程

描述酶活性与底物浓度([S])、酶最大速率(V_{max})和 Michaelis 常数(K_M)关系的数学方程:$v_{\circ} = V_{max}[S]/(K_M+[S])$。

microfilament 微丝

直径为 70Å 的细胞骨架元件,由肌动蛋白组成。

microheterogeneity 微不均一性

糖蛋白中碳水化合物成分的变异性。

minor groove 小沟

DNA 双螺旋上的凹槽,碱基对的糖苷键与之形成小于 180°的角。对于 B-DNA,这个沟比大沟窄。

mitochondria 线粒体

双层膜封闭的真核细胞器,其中发生需氧代谢反应,包括柠檬酸代谢(常称为三羧酸循环)、脂肪酸氧化和氧化磷酸化。

mixed inhibition 混合抑制

酶抑制作用的形式之一,其中,抑制剂同时结合酶和酶-底物复合物,从而对 K_M 和 V_{max}产生不同的影响。亦称非竞争性抑制。

modification methylase 修饰性甲基化酶

一种细菌酶,甲基化一段特定的 DNA 序列,作为限制性修饰系统的一部分。

molecular chaperone 分子伴侣

与未折叠或错折叠蛋白质结合,以促进正常折叠形成天然四级结构的蛋白质。亦称热激蛋白,见 chaperonins,分子伴侣。

molecular cloning 分子克隆

见 recombinant DNA technology(重组 DNA 技术)。

molecular sieve chromatography 分子筛层析

见 gel filtration chromatography(凝胶过滤层析)。

molecular weight 分子质量

见 M_r。

molecularity 反应分子数

参与基本化学反应的分子数。

molten globule 熔球

蛋白质折叠中坍塌的、但构象可变的中间体,具有大部分天然蛋白质的二级结构,但几乎没有三级结构。

monocistronic mRNA 单顺反子 mRNA

单个基因的 RNA 转录物。

monoclonal antibody 单克隆抗体

通过克隆杂交瘤细胞产生的单一类型的抗体分子,杂交瘤细胞由骨髓瘤细胞与可产生抗体的淋巴细胞融合获得。

monomer 单体

(1)结构单元,可用它来构建聚合物。(2)多亚基蛋白质中的一个亚基或原体。

monoprotic acid 单质子酸

仅能贡献一个质子的酸。

monosaccharide 单糖

单个糖组成的碳水化合物。

morphogen 形态发生素

分布在胚胎中、部分指导胚胎发育模式的物质。

motif 基序

二级结构元件的共同集合。亦称超二级结构。

M_r 相对分子质量

一种无因次量,被定义为粒子质量与 $1/12\,^{12}C$ 原子质量之比。也被称为分子质量。

mRNA

见 messanger RNA(信使 RNA)。

multienzyme complex 多酶复合物

一组非共价键结合的酶,催化代谢途径中两步或多步顺序反应。

multiple myeloma 多发性骨髓瘤

一种疾病,癌性 B 细胞增生,并产生大量被称为骨髓瘤蛋白质的单一抗体。

mutagen 诱变剂

在有机体中诱导突变的试剂。

mutase 变位酶

催化功能基团从分子的一处转移到另一处的酶。

mutation 突变

有机体遗传物质的可遗传变化。

MWC model of allosterism MWC变构模型

见 symmetry model of allosterism(别构对称模型)。

myocardial infarction 心肌梗死

由于供血不足导致的心肌死亡(心脏病发作)。

myofibril 肌原纤维

横纹肌中排列对齐的纤维束。

native structure 天然结构

大分子的完整折叠构象。

natural selection 自然选择

一种进化过程,复制体的持续存在,决定于它在已有条件下的生存和繁殖能力。

NDP 核苷二磷酸

near-equilibrium reaction 近平衡反应

反应自由能 ΔG 值接近于0,从而能根据底物和产物浓度决定反应向任一方向进行。

N-end rule N端规则

多肽N端残基的一致性与其在细胞中的半衰期的相关性。

NER 核苷酸切除修复

见 nucleotide excision repair(核苷酸切除修复)。

Nernst equation Nernst方程

还原电位差($\Delta\mathscr{E}$)与电子供体、受体浓度(A、B)之间的关系表达式:

$$\Delta\mathscr{E} = \Delta\mathscr{E}^{\circ} - RT/n\mathscr{F}\ln([A_{red}][B_{ox}]/[A_{ox}][B_{red}])。$$

neurotransmitter 神经递质

由神经细胞释放、改变另一神经细胞活性的物质。

neutral drift 中性漂移

通过随机变化而非自然选择固定下来的进化改变。

neutral solution 中性溶液

pH等于7的溶液($[H^+] = 10^{-7}mol\cdot L^{-1}$)。

***N*-glycosidic bond** *N*-糖苷键

见 glycosidic bond(糖苷键)。

nick translation 切口平移

双链DNA中单股断裂(切口),通过5′→3′外切核酸酶作用,从断口的5′端一侧去除残基、同时聚合酶在3′端一侧加入残基的同步反应而实现的逐步移动。

nitrogen fixation 固氮作用

大气 N_2 转化为生物可用形式如 NH_3 的过程。

***N*-linked oligosaccharide** *N*联寡糖

通过糖苷键连接到蛋白质Asn残基的酰胺基上的寡糖。

NMR 核磁共振

见 nuclear magnetic resonance(核磁共振)。

noncoding strand 非编码链

见 antisense strand(反义链)。

noncompetitive inhibition 非竞争性抑制

(1)混合抑制的同义词。(2)混合抑制的特殊情形,抑制剂以相等的亲和力($K_I = K_I'$)结合酶和酶-底物复合物,从而减小 V_{max}的表观值而 K_M 维持不变。

noncooperative binding 非协同性结合

配体与大分子的结合不影响该分子的其他结合位点的亲和性。

nonessential amino acid 非必需氨基酸

机体能够从共同中间物合成的氨基酸。

nonmediated transport 非介导运输

物质通过简单扩散的跨膜运动;和介导性运输相反

nonrepetitive structure 非重复性结构

一个多聚体的片段,它的骨架具有有序的排列,但不是以重复构象为特征的。

nonsense codon 无义密码子

见 stop codon(终止密码子)。

nonsense mutation 无义突变

一个编码氨基酸的密码子突变为终止密码子,结果造成翻译的不成熟终止。

nonsense suppressor tRNA 无义突变抑制因子 tRNA

一种突变的 tRNA,可以识别一个终止密码,所以它与氨酰基连接加到正在生长中的多肽链上,就减轻了结构基因中无义突变的效应。

nonshivering thermogenesis 非战栗生热作用

通过燃料氧化产生的热没有用于合成 ATP 或颤抖等肌肉运动。

Northern blotting RNA 印迹法

利用 RNA 与互补的单链 DNA 或 RNA 杂交,从而确定 RNA 中含有的特定碱基序列的方法,见 Southern blotting(DNA 印迹法)。

N-terminus N 端

见 aminoterminus(氨基末端)。

nt 核苷酸

NTP 核糖核苷三磷酸

nuclear magnetic resonance (NMR) 核磁共振

原子核在磁场中被辐射频率所激发,发射出的信号可用以鉴定原子和分子性质的一种波谱学方法,这种方法可用以测定蛋白质或核酸的三维分子结构。

nuclease 核酸酶

一种可降解核酸的酶。

nucleic acid 核酸

核苷酸残基的多聚体,主要的核酸是脱氧核糖核酸(DNA)和核糖核酸(RNA)。也称多聚核苷酸。

nucleolus (复数 nucleoli) 核仁

真核细胞核中的深染色区,是核糖体组装之处。

nucleophile 亲核物质

指含有非共享电子对的基团,它易于和一个缺电子的基团(亲电子的物质)反应。一个亲核物质(亲核子的)可与一个亲电子的物质(亲电子的)反应。

nucleoside 核苷

由含氮碱基和五碳糖(核糖或脱氧核糖)以 *N* 糖苷键连接的化合物。

nucleosome 核小体

由组蛋白八聚体和大约 200 个碱基对的 DNA 形成的复合物,它代表了真核细胞染色体最低水平的 DNA 组织形式。

nucleosome core particle 核小体核心颗粒

组蛋白与大约 146 个碱基对的 DNA 形成的复合物是一个紧密的盘状颗粒,DNA 在组蛋白八聚体的外面缠绕了大约两圈。

nucleotide 核苷酸

核苷酸是核苷被一个或几个磷酸基团酯化的化合物,核苷酸是核酸的单体单位。

nucleotide excision repair (NER) 核苷酸切除修复

一个多步骤过程,其中部分含有缺损的 DNA 被切除,并被正常的 DNA 所置换。

nucleus 细胞核

膜包被的细胞器,是真核细胞的遗传物质所在。

***O*-glycosidic bond** *O*-糖苷键

见 glycosidic bond(糖苷键)。

***O*-Linked oligosaccharide** *O*-联寡糖

寡糖通过糖苷键和蛋白质的 Ser 或 Thr 的侧链上的羟基连接。

oil 油

在室温下或液体状态的三脂酰甘油的混合物。

oil body 油脂小体

是植物细胞贮藏三脂酰甘油、直径为 1μm 的脂蛋白样颗粒。

bkazaki fragment 冈崎片段

在不连续的后随链 DNA 合成中形成的 DNA 短片段。

oligomer 寡聚体

(1) 短的多聚体,只含有几个连接在一起的单体单位。(2)一个蛋白质只含有很少几个原聚体(亚单位)。

oligosaccharide 寡糖

碳水化合物的聚合体,只有几个单糖残基。

Ω loop Ω 环

含有 6~16 个残基的多肽环。一般是在蛋白质的表面上,形成一个紧密的球形实体。

oncogene 癌基因

正常基因(原癌基因)的突变体,可能通过病毒感染获得,它干扰正常控制细胞生长和分化的机制,造成细胞增殖失控(癌)。

open reading frame (ORF)　可读框

一部分基因组,潜藏着编码蛋白质的密码子,这种核苷酸不含有终止密码子,其邻近具有合适的调控序列,并且表现出与机体中其他基因相同的密码子优先选用性。

open system　开放系统

可以与环境发生物质和能量交换的热力学系统。

operator　操纵基因

基因转录起始点上或其附近的一段 DNA 序列,它可以与阻遏物结合,从而控制基因的转录。

operon　操纵子

原核细胞的遗传单位,它包含了几个功能相关的基因,这些基因以单个 mRNA 分子被转录。

optical activity　光学活性

一个分子具有能使偏振光平面发生旋转的能力。

ordered mechanism　有序机制

带有强制性顺序的、使底物加到酶上去的一套顺序反应。

ORF　可读框

见 open reading frame(可读框)。

organelle　细胞器

真核细胞中的分化了的结构,如线粒体、核糖体或溶酶体,执行特殊的功能。

organic compound　有机化合物

含有碳元素的化合物。

osmosis　渗透作用。

溶剂从低浓度溶质区通过半透膜进入到高浓度溶质区的一种运动。

osmotic pressure　渗透压

阻止溶剂跨越半透膜(只容许溶剂通过,溶质不能通过的膜)从低浓度溶液向含有高浓度溶质的溶液净流动所必需施加的压力,任何溶质的 $1mol \cdot L^{-1}$ 溶液被半透膜隔离的渗透压为 22.4atm($1atm = 1.03125 \times 10^5 Pa$)。

overproducer　过量生产者

可产生大量外源 DNA 基因产物的遗传工程生物。

oxidative phosphorylation　氧化磷酸化作用

通过代谢燃料的氧化得到的自由能,用于从 $ADP + P_i$ 生成 ATP 的过程。

oxidizing agent　氧化剂

可以接受电子变成还原状态的物质。

oxidoreductase　氧化还原酶

可以催化氧化还原反应的酶。

oxygen debt　氧债

过分用力持续提高氧耗,用以补充 Cori 循环进行时肝脏中消耗的 ATP。

P/O ratio　P/O 比

从 $ADP + P_i$ 合成 ATP 分子的数目和被还原的氧原子数目之比。

p_{50}　半饱合配基浓度

以托(torr)为单位的配基浓度,是指使一个结合蛋白例如血红蛋白被配基半饱和时的配基浓度。

PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳

见 gel electrophoresis(凝胶电泳)。

pair-rule gene 配对规律基因

见 segmentation gene(区段化基因)。

paper chromatography 纸层析

根据分子在纸基质上的溶剂中移动速度而被分开的一种技术。

partial oxygen pressure (pO_2) 氧分压

气态氧的浓度,以托为单位。

passive-mediated transport 被动介导性传输

在热力学上自发的物质从高浓度到低浓度由载体介导的跨膜运动。也被称为促进性扩散。

Pasteur effect 巴斯德效应

酵母在厌氧条件下比在有氧条件下生长时大大增加糖的消耗。

pathogen 病原体

一种致病微生物。

PCR 聚合酶链反应

见 polymerase chain reaction(聚合酶链反应)。

pellagra 糙皮病

由于缺乏维生素烟酸(尼克酸)而引起的一种人类疾病,烟酸是辅因子 NAD^+ 和 $NADP^+$ 中所含的尼克酰胺的前体。

pentose phosphate pathway 戊糖磷酸途径

葡萄糖降解产生核糖-5-磷酸和 NADPH 的途径,也称为己糖单磷酸支路。

peptidase 肽酶

一种可以水解肽键的酶,也称为蛋白(水解)酶。

peptide 肽

少于 40 个残基的多肽。

peptide bond 肽键

一个氨基酸的 α-氨基和另一个氨基酸的 α-羧基之间的酰氨连接,在多肽链中,氨基酸残基之间均以肽键相连接。

peptide group 肽基

平面的—CO—NH—基团,包含着多肽中氨基酸残基间的肽键。

peptidoglycans 肽聚糖

交联的袋形大分子,含有多糖和多肽链,构成细菌的细胞壁。

peripheral protein 外周蛋白

和生物膜表面弱结合的蛋白质,又称外源蛋白。

periplasmic compartment 周质区室

格兰氏阴性细菌的细胞壁和外膜之间的空隙。

peroxisome 过氧(化)物酶体

具有特殊氧化功能的真核细胞器。

Perutz mechanism Perutz 机制

氧和血红蛋白间的一种协同性结合模式。在此模式中，氧的结合诱导蛋白质构象从脱氧型(T 状态)转变为氧化型(R 状态)。

PFGE 脉冲电场凝胶电泳

见 pulsed-field gel electrophoresis(脉冲场凝胶电泳)。

pH 酸质值

溶液酸度的定量表示，相当于 $-\lg[H^+]$。

phage 噬菌体

见细菌噬菌体(bacteriophage)。

phenotype 表型

生物体的自然特征。

Φ(phi) 扭角

用以表示在肽基中围绕 C_α—N 键的旋转位置。

phosphatase 磷酸(酯)酶

可以水解磷酸酯基团的一种酶。见 protein phosphatase(蛋白质磷酸酶)。

phosphodiester bond 磷酸二酯键

磷酸基团被二个醇基酯化的一种连接，例如在多聚核苷酸中，磷酸基连接相邻的核苷残基。

phosphoinositide pathway 磷酸肌醇途径

一种信号传递途径，激素与细胞表面的受体结合，诱导磷脂酶 C 催化磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸(PIP_2)的水解，产生肌醇-1,4,5-三磷酸(IP_3)和 1,2-二脂酰甘油酯，这二者都是第二信使。

phospholipase 磷脂酶

可水解甘油磷脂中一个或几个键的一种酶。

phosphorolysis 磷酸解作用

磷酸基取代水，断裂化学键。

phosphoryl group 磷酸化基团

分子中分子式为—PO_3H_2 的部分。

phosphoryl group-transfer potential 磷酸化基团转移势

测量磷酸化化合物，将其磷酸化基团转移给水的倾向，与其水解自由能相反。

photoautotroph 光自养生物

从日光获得能量的自养生物。

photon 光子

光能的一个包装基本单位，见 Plank's law(Plank 定律)。

photooxidation 光氧化作用

受激分子的衰变模式。通过将一个电子转移给另一个受体分子而发生的氧化作用。

photophosphorylation 光合磷酸化作用

ADP + P_i 合成 ATP 与光驱动产生的质子梯度的消散相偶联。

photoreactivation 光复活作用

损伤 DNA 的嘧啶二聚体，可利用光能使之转变为单体。

photorespiration 光呼吸作用

植物消耗 O_2 和放出 CO_2(一种光合作用产物的消耗),这是由 O_2 和 CO_2 与核酮糖二磷酸羧化酶竞争结合的结果。

photosynthesis 光合作用

在植物和细菌中,由光能驱动的将 CO_2 还原成为(CH_2O)的作用。

phytogenetic tree 进化系统树

重建一群生物体进化的可能途径,常常是基于同源蛋白质和核酸的顺序变异推出,这是一类家族树。

phylogeny 系统发育

生物体之间进化关系的研究。

p*I* 等电点

见等电点(isoelectric point)。

PIC 起始前复合物

见起始前复合物(preinitiation complex)。

Ping Pong reaction 乒乓反应

是一种基团转移反应,在这反应中,一个或几个产物在所有底物与酶结合之前就被释放出来。

pitch 螺矩

螺旋沿轴上升一圈的距离,α 螺旋的螺距为 5.4Å,B-DNA 为 34Å。

p*K*

表达酸给出质子(解离)倾向的一种量化,相当于 $-\lg K$,此处 K 是酸的解离常数。也称为 pK_a。

Plank's law Plank 定律

光子能量的表达,$E = hc/\lambda$,c 是光速,λ 是光的波长,h 是 Plank 常数($6.626 \times 10^{-34} J \cdot s$)

plaque 斑块

(1)在长有细菌的培养平板上,有些细菌被胞溶后形成的空斑。一般指示细菌被细菌噬菌体感染。(2)指动物组织中不溶物的沉积。

plasmalogen 缩醛磷脂

甘油磷脂的 C1 取代基通过醚连接,而不是酯连接。

plasmid 质粒

一种小的环状 DNA 分子,可以在细菌或酵母细胞中自主复制,质粒常常被修饰后用作克隆载体。

pmf 质子驱动力

见质子驱动力(proton motive force)。

pO_2 氧分压

见氧分压(partial oxygen pressure)。

point mutation 点突变

DNA 中某个碱基被另一个碱基所替代。DNA 复制时发生错误配对可导致点突变,也可以用化学方法改变原来的碱基导致点突变。

polarimeter 旋光仪

测量溶液光旋转的一种设备,可用来测定物质的光学活性。

poly(A) tail 多聚(A)尾

真核生物的 mRNA 转录[①] 后在 3′端附加的一段腺苷酸残基序列

polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) 聚丙烯酰胺凝胶电泳

见凝胶电泳(gel electrophoresis)。

polycistronic mRNA 多顺反子 mRNA

细菌操纵子的 RNA 转录本,它编码几个多肽。

polycythemia 红细胞增多症

以红细胞数目增加为特征的状态。

polyelectrolyte 多聚电解质

一个大分子带有多个带电基团。

polymer 多聚体

一个分子含有许多较小的单位,它们有组织地连接在一起,多聚体可以是线状的或分支的,也可能含有一种或几种结构单位(单体)。

polymerase 聚合酶

催化核苷酸残基加合在一条多聚核苷酸链上的酶。加合是通过链的 3′-OH,对进入的核苷三磷酸的 α 磷酸基团发起亲核进攻完成的,DNA 和 RNA 指导的聚合酶需要一个模板分子,加上去的核苷酸必须和模板的碱基配对。

polymerase chain reaction (PCR) 聚合酶链反应

一个扩增 DNA 片段的方法。引物和待扩增的 DNA 片段的两端杂交,两个引物之间的 DNA 片段反复几轮复制。

polynucleotide 多聚核苷酸

见核酸(nucleic acid)。

polypeptide 多肽

氨基酸残基通过肽键连接的方式,形成的多聚体。

polyprotic acid 多元酸

可以提供一个以上质子的物质。多元酸具有多种离子化状态。

polyribosome 多聚核糖体

在翻译进行过程中,带有多个核糖体的一个 mRNA 转录本,又称 polysome。

polysaccharide 多糖

一个多聚的碳水化合物含有多个单糖残基,又称聚糖。

polysome 多聚体

见 polyribosome(多聚核糖体)。

polytene chromosome 多线染色体

染色体于多轮 DNA 复制后,子代分子仍保持和染色体的结合和对齐。

Polyunsaturated fatty acid 多不饱和脂肪酸

---

① 原文为“翻译”。——译者注。

烃链上含有一个以上双键的脂肪酸。

porphyrias 血卟啉症

血红素生物合成中的遗传缺陷，它引起卟啉和/或它的前体的堆积。

postreplication repair 复制后修复

见重组修复(recombination repair)。

posttranscriptional modification 转录后修饰

在 RNA 合成后，核苷酸残基的去除、增加或修饰。

posttranslational modification 翻译后修饰

将已经掺入到多肽中的氨基酸残基去除，或修饰成其衍生物。

prebiotic era 前生物时代

指大约 46 亿年前地球刚形成和 35 亿年前生物有机体出现之间的这段时期。

precursor 前体

指一个实体通过一个步骤，例如进化或化学反应，成为另一个实体。

preinitiation complex (PIC) 起始前复合物

集结转录因子并结合到 DNA 上，使 DNA 可以被 RNA 多聚酶转录。

pre-mRNA 前 mRNA

见不均一的核 RNA(heterogeneous nuclear RNA)。

pre-rRNA 前 rRNA

一种不成熟的 rRNA 转录物。

pre-tRNA 前 tRNA

一种不成熟的 tRNA 转录物。

preproprotein 前蛋白原

蛋白质同时带有信号肽(前蛋白)和肽原(蛋白质)。

preprotein 前蛋白

带有信号肽的蛋白质，当蛋白质通过内质网膜转位后该信号肽就被切除。

Pribnow box Pribnow 盒

是原核生物启动子中的元件，带有保守序列：TATAAT，位于转录起始点的 -10 位置。

primary active transport 初级主动运输

由 ATP 水解放能驱动的跨膜运输。

primary structure 初级结构

多聚物中残基的序列。

primary transcript 初级转录物

转录作用的即刻产物，在成为具有完全功能前，可能还要经过修饰。

primer 引物

是一种寡聚核苷酸，可作为添加的聚合反应的起始点，此聚合反应是由 DNA 聚合酶催化，生成多聚核苷酸。引物和模板多聚核苷酸的一个片段碱基配对，形成一段短的双链片段，然后按模板指导的聚合反应延伸。

primosome 引物体

为一蛋白质复合物，它促发在非连续性 DNA 合成中冈崎片段的合成。

prion　朊蛋白

是一种蛋白质,它的错误折叠造成聚集,并引起牛海绵样脑病变的神经退行性病变的症状,及其相关疾病。错误折叠的朊蛋白会诱导正常折叠的朊蛋白成为错误折叠,因此它的作用就像一个传染源。

probe　探针

带标记的单链 DNA 或 RNA 片段在筛选过程中能与目标 DNA 或 RNA 杂交。

processive enzyme　加工酶

这是一种酶,它催化多轮聚合反应,而并不从生长中的多聚物上解离下来。

prochirality　原手性

指一种非手性分子的性质。它具有一个基团,当这个基团被另一个基团置换后即成为手性分子。

proenzyme　酶原

酶的无活性前体。

prokaryote　原核生物

是一种单细胞生物,它的核外面缺少膜包裹。所有的细菌都是原核生物。

promoter　启动子

DNA 的一段序列。RNA 聚合酶结合在上面,促发转录作用。

proofreading　校对

酶的一种额外催化活性,这种酶活性具有纠正初级酶活性造成的错误。

prophage　前噬菌体

一种细菌噬菌体,它稳定地插入宿主的基因组中。

propeptide　肽原

不成熟蛋白质的一段多肽片段,它必须被蛋白水解酶切除才能激活此蛋白质。

proprotein　蛋白质原

蛋白质的无活性前体,必须进行有限的蛋白水解剪除它的肽原,此蛋白质才能完全被活化。

prostaglandin　前列腺素

见类花生四烯酸(eicosanoid)。

prosthetic group　辅基

永久性地(常常是共价地)与一个酶结合的一种辅因子。

protease　蛋白(水解)酶

见肽酶(peptidase)。

proteasome　蛋白酶体

是一个含多种蛋白质的复合体,具有一个中空柱状的核心,细胞内蛋白质在其中被 ATP 依赖的过程降解为肽(反复循环)。

protein　蛋白质

包含有一个或几个肽链的大分子。

protein kinase　蛋白质激酶

这是一种酶,催化从 ATP 上将一个磷酸基团转移到蛋白质的 Ser、Thr 或 Tyr 残基的 *OH* 基团上。

protein module 蛋白质组件

一段大约 40～100 个氨基酸残基组成基元序列，它们可能出现在无关的蛋白质中，或者以多点排列出现在一个蛋白质中。

protein phosphatase 蛋白质磷酸酶

它催化蛋白质上磷酸化基团的水解切除。

proteoglycan 蛋白聚糖

一种细胞外的蛋白质和糖胺聚糖的聚合物。

proto-oncogene 原癌基因

癌基因的正常细胞内类似物：原癌基因的突变，可能会产生一种癌基因，它引起细胞增殖作用的失控。

protomer 原聚体

指寡聚蛋白质中二个或更多的相同单位中的一个。一个原聚体可能含有一条或几条多肽链。

proton jumping 质子跳跃

指质子在氢键合水分子中的快速运动，质子跳跃是水合质子和羟基离子快速移动通过水溶液的主要原因。

protonmotive force (pmf) 质子驱动力。

电化学质子梯度的自由能，这种梯度是在电子传递过程中形成的。

proximity effect 近邻效应

一种催化机制，激活作用的反应自由能可以因反应基团聚集在一起而降低。

pseudo-first-order reaction 假一级反应

一个双分子反应的速度与其中一种单一反应物的浓度成正比。

pseudogene 假基因

一种不转录[①]的 DNA 序列，它显然是重复基因的不全遗迹。

ψ(psi) 指一个扭角，用以描述一个肽基团中绕 C_α—C 键的旋转位置。

pulse labeling 脉冲标记

追踪代谢途径的一种技术，细胞或者反应体系短暂接触高水平的标记化合物。

pulsed-field gel electrophoresis(PFGE) 脉冲场凝胶电泳

一种电泳方法。电极环绕散布在琼脂糖平板胶的周边，然后顺序地起动脉冲，使 DNA 分子必须连续地重新定向，因此可使非常大的分子按照它们的大小分开。

purine nucleotide cycle 嘌呤核苷酸循环

天冬氨酸转变为延胡索酸，通过 AMP 脱氨基作用转变为 IMP，可补充三羧酸循环的中间代谢物。

purine 嘌呤

嘌呤类化合物的衍生物，是一个平面芳香族杂环化合物，腺嘌呤和鸟嘌呤是核苷酸中的两个含氮碱基，都是嘌呤。

pyranose 吡喃糖

---

① 原文为“不表达”(unexpressed)。——译者注

一个六环糖。

pyrimidines 嘧啶

嘧啶类化合物的衍生物，是一个平面芳香族的杂环化合物，胞嘧啶、尿嘧啶和胸腺嘧啶是核苷酸中的三个含氮碱基，它们都是嘧啶衍生物。

pyrophosphoryl group 焦磷酸化基团

见 diphosphoryl group(二磷酸化基团)。

q

热吸收的热力学术语。

q_P.

在恒压下热吸收的热力学术语。

Q cycle Q 循环

伴随质子传递的电子循环流动，涉及线粒体中的电子传递复合物 III 的 CoQ 和光合作用中电子传递的 CoQ，一个稳定的半醌中间物。

quantum (*pl*. quanta) 量子

一种能量的包装，见光子(photon)。

quantum yield 量子产率

反应分子与光子吸收的比例。

quaternary structure 四级结构

大分子各亚基间的空间排列。

R group R 基团

有机分子可变部分的符号。例如氨基酸的侧链。

R state R 状态

别位蛋白质的两种构象中的一个，另一个是 T 状态。

racemic mixture 消旋混合物

化合物的两种对映体以等量存在的样品。

radioimmunoassay (RIA) 放射免疫测定法

测量分子浓度的一种技术，它是基于该分子具有阻断少量带放射标记的分子和相应抗体结合的能力。

radionuclide 放射性核素

有放射活性的同位素。

Ramachandran diagram Ramachandran 图

Φ 值和 Ψ 值作图，指示立体上所容许的多肽构象。

random coil 无规卷曲

一种总体上无序和快速波动的多聚物的构象。

random mechanism 随机机制

底物加到酶上没有强制性的顺序反应。

rate constant(*k*) 速度常数

一个化学反应的速度和反应物(S)浓度(s)之间的比例常数。

rate enhancement 速度增强

催化反应和非催化性化学反应速率的比例。

rate equation 速率方程

作为反应物浓度的函数,反应的时间依赖性进程的数学表达式。

rate-determining step 限速步骤

在多步骤的反应中,具有最高的过渡态自由能的步骤;它是最慢的一步。

reaction coordinate 反应协调

反应进程中最低自由能的途径。

reaction order 反应级数

浓度项指数的总和,它出现在反应的速率方程中。

reading frame 读框

一群三个一组的核苷酸,它的序列相应于多肽的序列。

receptor 受体

一种结合蛋白,对自己的配基是专一的,当配基与之结合时,可引发具体的生化效应。

receptor tyrosine kinase 受体酪氨酸激酶

是一种激素受体,激素与之结合导致受体的细胞内结构域被激活,使其他蛋白质和或同一受体的其他亚基上的酪氨酸残基磷酸化。

receptor-mediated endocytosis 受体介导的内吞作用

细胞外的配基与细胞表面的特异受体结合,受体-配基复合物被细胞内吞的过程。

recombinant 重组体

不同来源的 DNA 被组建成的 DNA 分子,也被称为嵌合体。

recombinant DNA technology DNA 重组技术

分离、放大和修饰特异的 DNA 序列,也称为分子克隆或基因工程。

recombination 重组作用

分离的 DNA 片段间交换多聚核苷酸链。一般重组作用发生在具有广泛同源性的 DNA 片段之间,定点重组发生在二个短的特异性的 DNA 序列之间。

recombination repair 重组修复

一种使受损伤 DNA 修复的机制,受损 DNA 与一个同源片段重组,交换一部分受损伤的链。然后以此为模板,置换受损伤的残基。又被称为复制后修复。

redox center 氧还中心

能进行氧化还原反应的基团。

redox couple 氧还偶联

见半反应(half-reaction)。

reducing agent 还原剂

一种能提供电子然后自己变成氧化态的物质。

reducing equivalent 还原当量

这是一个用来描述电子在氧还反应中,从一个分子转移到另一个分子的术语。

reducing sugar 还原糖

带一个异头碳的糖,该碳原子还没有形成糖苷键,因此可以被温和的氧化剂氧化。

reduction potential (ξ) 还原势

对一种物质获得电子的倾向的度量。

reductive pentose phosphate cycle 还原性戊糖磷酸循环

见卡尔文循环(Calvin cycle)。

regular secondary structure 规则性二级结构

一个多聚物的片段,它的骨架采取有规律的重复构象。

release factor 释放因子。

一种蛋白质,它能识别一个终止密码,从而帮助诱导核糖体终止多肽链的合成。

renaturation 复性

变性大分子的重新折叠,从而获得它原来的构象。

repetitive DNA 重复 DNA

DNA 片段大至好几千个碱基,在机体的基因组内存在多个拷贝,它们常常是头尾衔接,成串排列。

replica plating 影印铺板

将酵母集落、细菌集落或噬菌斑从一个培养平板转移到另一个培养平板上、一张膜上、或者一张滤纸上,保留了细胞原来平板上的分布状态。

replication 复制

制造一个相同的 DNA 分子拷贝的过程,当 DNA 复制时,亲本的多聚核苷链分离,这样每一条链都能指导合成一条互补的子链,从而得到两个完整的 DNA 双螺旋。

replication fork 复制叉

一个复制中的 DNA 分支点中的分支点。在这个分支点中亲本分子的二条链分开,作为子链合成的模板。

replicon 复制子

真核 DNA 的一种单位,从一个复制起始点复制而来。

replisome 复制体

含有蛋白质组装体的 DNA 多聚酶,它在复制叉处催化 DNA 前导链和后随链的合成。

repressor 阻遏物,阻遏蛋白

结合在基因上或其附近的蛋白质,起阻抑基因转录的作用。

RER 粗面内质网

见 rough endoplasmic reticulum(粗面内质网)。

residue 残基

聚合物单体单位的专门名词。

resonance energy transfer 共振能量转移

见 exciton transfer(激子转移)。

respiratory distress syndrome 呼吸窘迫综合征

早产婴儿的呼吸困难,由肺泡坍陷引起,是肺表面活性剂合成不足所致。

restriction endonuclease 限制性内切核酸酶

是一种细菌酶,作为限制修饰系统的一部分,切割专一的 DNA 序列。

restriction fragment length polymorphism(RFLP) 限制性片段长度多态性

同一物种不同个体间的 DNA 序列遗传性差异(多态性),导致特定的限制性内切核酸酶切

割位点的变异，从而产生不同长度的 DNA 片段。

restriction map 限制酶图谱

是 DNA 分子的一个图示，它表明限制性内切核酸酶的识别位点。图谱的制作可通过分析这些内切酶消化 DNA 产生的片段来完成。

restriction-modification system 限制修饰系统

识别某一特定 DNA 序列的一对相匹配的细菌酶：配对中的甲基化酶的修饰作用，是将这一序列的某些碱基甲基化，若该序列未被甲基化，则配对的限制性内切核酸酶就会在其位点上切断 DNA。因此这是一个消除外来 DNA（例如病毒）的防御系统。

reticulocyte 网织红细胞

未成熟的红细胞，这些细胞活跃地合成血红蛋白。

retrovirus 反转录病毒

遗传物质是 RNA 的病毒，当感染宿主细胞时，RNA 必须被反转录成双链 DNA。

reverse transcriptase 反转录酶

用 RNA 为模板的 DNA 聚合酶。

reverse turn 反转

一种多肽构象，在这构象中肽链突然反向，通常转角由 4 个连续的残基构成，亦被称为 β-转折。

RFLP 限制性片段长度多态性

见限制性片段长度多态性（restriction fragment length polymorphism）。

RIA 放射免疫测定

见放射免疫测定（radioimmunoassay）。

ribonucleic acid 核糖核酸

见核糖核酸（RNA）。

ribonucleotide' 核糖核苷酸

戊糖是核糖的核苷酸。

ribosomal RNA（rRNA） 核糖体 RNA

构成大部分核糖体的 RNA，它是多肽合成的场所。提供了核糖体结构支架，显然，催化肽键形成。

ribosome 核糖体

在 mRNA 指导下合成多肽的细胞器，它由约 2/3 的 RNA 和 1/3 的蛋白质所组成。

ribozyme 核酶

具有催化活性的 RNA 分子。

rickets 佝偻病

儿童维生素 D 缺乏症，以发育迟缓和骨畸形为特征。

rigor mortis 尸僵

死亡后肌肉僵硬。

RNA 核糖核酸

核糖核苷酸聚合物，主要形式包括信使 RNA（mRNA）、转移 RNA（tRNA）和核糖体 RNA（rRNA）。

RNA editing RNA 编辑

转录后 mRNA 上碱基的插入、删除或改变。

Rossmann fold Rossmann 折叠

见 dinucleotide binding fold(二核苷酸结合折叠)。

rough endoplasmic reticulum(RER) 粗面内质网

指内质网结合核糖体的部分,在此合成膜蛋白、分泌蛋白或到达某些细胞器的蛋白质。

rRNA 核糖体 RNA

见 Ribosomal RNA(核糖体 RNA)。

***RS* system** RS 系统

见 Cahn-Ingold-Prelog system。

S 熵

见 entropy(熵)。

S 沉降函数

沉降系数的单位,$1S=10^{-13}s$。

saccharide 糖类

见 carbohydrate(糖类)。

salt bridge 盐桥

见 ion pair(离子对)。

salting in 盐溶

蛋白质(或其他分子)的溶解度随着低盐浓度的增加而增加。

salting out 盐析

蛋白质(或其他分子)的溶解度随着高盐浓度的增加而降低。

sarcomere 肌原纤维节

指肌纤维的重复单位,由细丝和粗丝构成,在肌肉收缩时相互滑动。

satellite DNA 卫星 DNA

指具有高度重复 DNA 片段的 DNA 区域;因其特别的碱基组成,在密度梯度离心时,与其他 DNA 分开,形成被称为卫星条带的 DNA。

saturated fatty acid 饱和脂肪酸

烃链里不含任何双键的脂肪酸。

saturation 饱和

大分子的所有配体结合位点都被配体所占有的一种状态。

Schiff base 希夫碱

伯胺与醛或酮形成的亚胺。

SCID 重度联合免疫缺陷疾病

见 severe combined immunodeficiency disease(重度联合免疫缺陷疾病)。

scrapie 羊搔痒症

见 bovine spongiform encephalopathy(牛海绵状脑病)。

screening 筛选

鉴定含有所需基因的克隆技术。

scurvy 坏血病

由维生素C(抗坏血酸)缺乏引起的疾病,其后果是结缔组织中胶原链不适当地交联。

SDS-PAGE SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

在去污剂十二烷基磺酸盐(SDS)存在下的聚丙烯酰胺凝胶电泳,SDS使多肽变性、并带有相同的电荷密度,从而可使多肽按其大小而不是按原有的电荷被分开。

second messenger 第二信使

胞内的离子或分子作为细胞外事件(例如配体结合细胞表面受体)的信号。

secondary structure 二级结构

聚合物主链原子的局部空间排列,不涉及取代侧链的构象,α螺旋和β折叠是蛋白质通常的二级结构元件。

second-order reaction 二级反应

反应的速率与反应物浓度的平方成正比,或与两种反应物的浓度积成正比。

segment polarity gene 区段极性基因

见 segmentation genes(区段化基因)。

segmentation gene 区段化基因

指确定体节区段的正确数目和极性的昆虫基因。间隙基因、成对规则基因和区段极性基因都是区段化基因。

selectable marker 选择性标记

一个基因的产物具有活性,例如:抗生素抗性,因此在适当的条件下具有该基因的细胞能与缺少这一基因的细胞区别开来。

selfish DNA 自在DNA

基因组中无明显功能的DNA,亦称无用DNA。

semiconservative replication 半保留复制

DNA复制的自然方式,在这种复制中,每条新的双股螺旋分子中,有一条链来自亲代分子,另一条链为新合成链。

semidiscontinuous replication 半不连续复制

在这种DNA复制方式中,一条链作为连续的多核苷酸链(前导链,leading strand)被复制,与此同时另一条链却以一系列不连续的冈崎片段被复制。最后连接成一条完整的DNA链(后随链,lagging strand)。

sense strand 有意义链

与被转录的链互补的DNA链。它与合成的RNA,除T替换U外,具有相同的碱基序列,亦被称为编码链。

sequential model of allosterism 别构的顺序模型

寡聚体蛋白质亚基,随着结合配体数目的增加,以逐步方式改变构象的一种别构模式。

sequential reaction 顺序反应

反应发生前,所有底物必须与酶结合,可按有序或随机机制进行。

serine protease 丝氨酸蛋白酶

在酶活性中心内有活性丝氨酸的肽水解酶。

severe combined immunodeficieney disease(SCID) 重度联合免疫缺陷病

一种严重损害免疫系统的遗传病，其缺陷是缺乏腺苷脱氨酶。

Shine-Dalgarno sequence　SD序列

许多原核生物在mRNA的起始密码子上游约含10个富含嘌呤的核苷酸序列，与16S rRNA的3′端部分互补，这一序列有助于核糖体在翻译起始处定位。

sickle-cell anemia　镰状细胞贫血

因突变体血红蛋白(Glu 6β→Val)的存在，红细胞变形受损的一种遗传病。变体血红蛋白以其脱氧形式聚合成纤维。

shotgun cloning　鸟枪法克隆

机体的基因组以随机片段的形式进行克隆。

σ factor　σ因子

细菌RNA聚合酶全酶的一个组分，它识别基因启动子，一旦链合成起始，即被释放。

signal hypothesis　信号假说

描述由信号肽引导分泌蛋白和跨膜蛋白的识别、跨膜运动和蛋白水解过程的途径。

signal peptide　信号肽

决定蛋白质在细胞内定位的短肽序列，例如，N端13～36个残基的序列，介导细胞器对新的分泌性和跨膜蛋白的识别，将蛋白质转运到内质网。这种前导肽随后被信号肽酶切割。

signal transduction　信号传导

通过配体与细胞表面的受体结合，将细胞间的信号传递到细胞内部，通过顺次激活细胞内过程引起细胞反应，包括产生第二信使。

silencer　沉默子

与转录起始位点有一定距离的一段DNA序列，它可与转录阻遏物结合。

single-displacement reaction　单置换反应

在反应中，一个基团以协同方式从一个分子转移到另一个分子(无中间体)。

site-directed mutagenesis　定点诱变

以特定的方式突变克隆基因的技术。

site-specific recombination　位点特异性重组

见recombination(重组)。

size exclusion chromatography　大小排阻层析

见gel filtration chromatography(凝胶过滤层析)。

small nuclear ribonucleoprotein(snRNP)　核内小核糖核蛋白

蛋白质和参与mRNA剪接的核内小RNA形成的复合体。

small nuclear RNA(snRNA)　核内小RNA

高度保守的、约60～300核苷酸的RNA，它参与mRNA剪接。

snRNA　核内小RNA

见small nuclean RNA(核内小RNA)。

snRNP　核内小核糖核蛋白

见small nuclear ribonucleoprotein(核内小核糖核蛋白)。

soap　肥皂

长链脂肪酸的盐，它有一个极性头基团和一个长的疏水尾部。

solvation 溶剂化作用

指被几层有序溶剂分子包围的一种状态,水化作用是被水溶剂化。

somatic recombination 体细胞重组

发生在非性细胞系的遗传重组。

sonication 超声处理

用高频声波辐射,这种处理常被用于破碎细胞和亚细胞膜性结构。

SOS response SOS 反应

细菌辨认损伤的 DNA、停止其复制、并修复损伤的一个系统,它是一种有错误倾向的方式。

Southern blotting DNA 印迹法

电泳后鉴定 DNA 碱基序列的方法,利用 DNA 序列能与标记的 DNA 或 RNA 互补的单链片段杂交的性能。亦可参见 Northern blotting(RNA 印迹法)。

sphereocytosis 球形红细胞症

红细胞细胞骨架的遗传异常,导致细胞刚硬和球形,引起溶血性贫血。

sphingolipid 鞘脂

18 碳鞘氨醇的衍生物,包括神经酰胺、脑苷脂和神经节苷脂。带磷酸基团的鞘脂称为鞘磷脂。

spliceosome 剪接体

含有蛋白质、snRNP 和 mRNA 前体的 50～60s 的颗粒,它进行剪接反应,使 RNA 前体转变为成熟的 mRNA。

splicing 剪接

通常为核糖核蛋白催化的过程;在这一过程中内含子被除去,外显子连接生成成熟的转录本,某些 RNA 是自身剪接。

spontaneous process 自发过程

指无需从体系外面输入自由能就发生的热力学过程,自发性与过程的速率无关。

stacking interactions 堆积相互作用

在多核苷酸中,连续堆积的碱基和碱基对之间稳定的范德华相互作用。

standard state 标准状态

包括研究对象的单位活性、温度为 25℃、气压为 1 个大气压、pH 为 0 等一组条件。

参见 biochemical standard state(生物化学标准状态)。

starch 淀粉

线性和分支形葡萄糖多聚物的混合物,为植物的主要能量储备。

state function 状态函数

诸如能量、焓、熵和自由能等的量,量值仅取决于体系现时的状态,而与如何到达这一状态无关。

steady state 稳态

在一开放体系中的一组条件,在这条件下,单个组分的生成和降解达到平衡,因此该体系不随时间而变化。

stem-and-loop 茎-环

单链核酸的一种二级结构元件,在此结构中两段互补区形成碱基配对的茎,和不成对碱基形

成的环相连接。

stereoisomers 立体异构体

不同构型的手性分子,在分子中至少有一个不对称中心,不然,分子完全相同。

steroid 类固醇

许多天然存在的由四个融合环组成的类脂,它们多数是胆固醇衍生的激素。

sterol 固醇

类固醇的醇衍生物。

sticky end 黏性末端

为限制性内切核酸酶交错切割专一序列形成的 DNA 片段的单链末端,这种单链突出端与类似切割形成的 DNA 突出端序列互补。

stop codon 终止密码子

一个不编码氨基酸的三核苷酸序列,但它能导致翻译的终止,亦被称为无意义密码子。

striated muscle 横纹肌

随意肌和骨骼肌,它们在显微镜下呈现可见条纹的外观。

stringent response 应急反应

细菌在不良生长环境下扫除代谢障碍的反应,反应由 ppGpp 介导,包括降低 rRNA 的合成。

stroma 基质

在叶绿体内部,由酶、小分子和离子组成的溶液,是碳水化合物合成的场所。

stromal lamellae 基质片层

在叶绿体中连接基粒的膜性组装。

strong acid 强酸

在水溶液中基本上完全电离的酸,强酸的解离常数远大于 1($pK<0$)。

structural gene 结构基因

编码蛋白质的基因。

substrate 底物

酶促反应中的反应物。

substrate cycle 底物循环

两个相反的代谢反应。它们共同行使功能,提供一个控制点,以调控代谢流量。亦被称为无效循环(futile cycle)。

substrate-level phosphorylation 底物水平磷酸化

直接将磷酸基团转移到 ADP 上生成 ATP。

subunit 亚基

组成一个蛋白质的几个多肽链中的一条多肽链。

sugar 糖

简单的单糖或二糖。

suicide substrate 自杀底物

见 mechanism-based inhibitor(机理型抑制剂)。

sulfhydryl group 巯基

分子中分子式为—SH 的部分。

supercoiling 超螺旋

双螺旋过分盘旋或盘旋不足引起的共价闭环双螺旋 DNA 的拓扑状态，此环形 DNA 具有特别的扭曲外观，亦被称为超螺旋(superhelicity)。

superhelicity 超螺旋

见 supercoiling(超螺旋)。

super secondary structure 超二级结构

见 motif(基元)。

suppressor mutation 抑制突变

取消别的突变效应的突变。

surface labeling 表面标记

利用脂不溶性蛋白质标记试剂识别膜蛋白暴露在溶剂中的部分的一项技术。

symbiosis 共生

二种生物体间的一种相互依赖关系。

symmetry model of allosterism 别构的对称模型

别构行为的一种模型，在这一模型中，寡聚蛋白质的所有亚基的构象变化按一致的方式被约束，从而维持该寡聚蛋白质的对称性。亦称之为别构的 MWC 模型。

symport 同向转运

二种分子按相同方向同时跨膜转运。

syncytium 合胞体

含多个核的单个细胞，它是由于重复性核分裂所致，但不形成新的原生质膜。

synonymous codon 同义密码子

和另外的密码子一样编码相同氨基酸的密码子。

T state T 状态

别构蛋白两种构象之一，另一种构象是 R 状态。

T

见 twist(扭曲)。

$t_{1/2}$

见 half-time(半衰期)。

T→R transition T→R 转换

配体结合诱导别构蛋白质的构象转换。

TATA box TATA 框

真核生物的启动子元件，它处于转录起始位点上游 10～27 个核苷酸，具有共有序列 TATAAA。

tautomers 互变异构体

只是氢原子位置不同的异构体。

taxonomy 分类学

研究生物分类的科学。

Tay-Sachs disease Tay-Sachs 病

由于氨基己糖苷酶 A 缺乏所引起的致命的鞘脂储存疾病，该酶降解神经节苷脂 G_{M2}。

TCA cycle 三羧酸循环

见(citric acid cycle)柠檬酸循环。

telomerase 端粒酶

一种含有 RNA 的 DNA 聚合酶,它利用 RNA 为模板,催化特定的富含 G 的序列重复地加成到真核生物的 DNA 分子的 3′末端,形成端粒。

telomere 端粒

真核生物的线状染色体末端,由 3′端串联重复的、富含 G 的短序列以及和互补的 5′端序列所组成。

tertiary structure 三级结构

单链聚合物的完整三维结构,包括侧链。

tetramer 四聚体

四个单体单位组成的组装体。

thermodynamics 热力学

研究各种形式能量之间的关系。

thermophile 嗜热生物

在高温度茁壮生长的生物体。

thick filament 粗丝

主要由数百个肌球蛋白分子构成的肌节元件。

thin filament 细丝

主要由肌动蛋白和原肌球蛋白一起组成的肌节元件。

threading 贯穿

测定多肽三维结构的一种技术,通过测多肽和某一已知多肽的结构相匹配,从而计算测定其稳定性。

3′-end 3′端

多核苷酸链的末端,其 C3′并不被别的核苷酸残基所酯化。

thylakoid 类囊体

叶绿体最里面的区室,它是由叶绿体的内膜内陷形成,类囊体膜是光合作用的光反应部位。

titration curve 滴定曲线

用图解表示含酸或含碱的溶液的 pH 和质子解离度之间的关系,质子解离度大致相当于加入到溶液中的强酸或强碱量。

T_m 解链温度

见 melting temperature(解链温度)。

topoisomerase 拓扑异构酶

改变 DNA 超螺旋的酶,它能在单链或双链上催化链的断裂,通过 DNA 裂口,再修复断裂。

torsion angle 扭角

用 4 个连续原子间的键来描述的双面角,在多肽中用扭角 ϕ 和 Ψ 来表示肽基团在主链中的构象。

trans peptide 反式肽

指连续 α-碳原子位于肽键相反侧的构象。

transamination 转氨基作用

氨基从一个氨基酸转移到 α-酮酸上，生成一个新的 α-酮酸和一个新的氨基酸。

transcription 转录

以 DNA 为模板合成 RNA 的过程，遗传信息由此从 DNA 转移到 RNA。转录由 RNA 聚合酶所催化，并受许多其他蛋白质的激活。

transcription factor 转录因子

通过和基因或其附近 DNA 序列的结合，或与其他和基因结合的蛋白质的相互作用，而促进基因转录的蛋白质。

transfer RNA tRNA，转移 RNA

输送特定氨基酸的小 L 形 RNA。氨基酸共价连接在 tRNA 的 3′端，按照和核糖体结合的 mRNA 的序列输送到核糖体上。通过 tRNA 三核苷酸反密码子的碱基，和 mRNA 密码子互补，选出合适的 tRNA，氨基酸被转到成长中的多肽上。

transferase 转移酶

催化功能基团从一个分子转移到另一个分子的酶。

transformation 转化

通过导入外来 DNA，使细菌细胞的遗传信息永久性改变。

transgene 转基因

在宿主生物体稳定表达的外来基因。

transgenic organism 转基因生物

稳定表达外来基因（转基因）的生物。

transition state 过渡态

在化学反应的反应坐标图中，处于最大自由能时的分子组装状态。

transition state anolog 过渡态类似物

指几何学和电子学上类似反应过渡态的稳定物质。

transition 碱基转换

一种嘌呤（或嘧啶）被另一种嘌呤（或嘧啶）置换的突变。

transition temperature 相变温度

指脂双层从胶状固体转向较为流动的液晶形式时的温度。

translation 翻译

包含在 RNA 核苷酸序列中的信息，转换成按遗传密码指定的多肽的相应氨基酸序列的过程。翻译是由核糖体催化，同时需要其他的 mRNA、tRNA 和多种蛋白质因子的参与。

transmembrane protein 跨膜蛋白

完全跨膜的整合蛋白。

transpeptidation 转肽基作用

发生在核糖体上的过程，和 tRNA 结合的新生肽链被转移到和 tRNA 结合的酰基上，生成一个新的肽键，因此多肽通过其 C 端加一个残基而伸长。

transposable element 转座元件

见 transposon（转座子）。

transposition 转座作用

遗传物质从基因组的一个部分迁移(复制)到另一部分,在某些情况下,可从一种生物转移至另一种生物。

transposon 转座子

基因组里能从一个位置迁移(复制)到其他位置的遗传单位,有些转座子携带基因,亦被称作转座元件。

transverse diffusion 横向扩散

脂从脂双层的一个单脂层移向另一单脂层,亦被称为翻转(flip-flop)。

transversion 碱基颠换

嘌呤(嘧啶)被嘧啶(嘌呤)所置换的突变。

treadmilling 踏车

加一个单体单位到线性聚集体的一端,例如肌动蛋白纤丝,而从其相反一端除去一个单体单位,因此该聚集体的长度保持不变。

triacylglycerol 三酰甘油

三个脂肪酸被甘油酯化的脂,亦被称为甘油三酯。

tricarboxylic acid(TCA)cycle 三羧酸循环

见 citric acid cycle(柠檬酸循环)。

trimer 三聚体

由三个单体单位构成的聚合体。

tRNA 转移 tRNA

见 transfer RNA。

tumor suppressor 肿瘤阻遏因子

丢失或失活可致癌的蛋白质。

turnover number 转换数

见 k_{cat}。

twist(*T*) 扭曲

一股共价闭合的双螺旋 DNA 环绕双重轴的完全的绕转数。右手超螺旋卷曲为正向,左手超螺旋卷曲为负向。

U

热力学的能量符号。

ubiquitination 泛素化

泛素共价连接真核生物的胞内蛋白质,在大多数情况下,这将促使该蛋白质被蛋白酶体降解。

ultracentrifugation 超速离心

大分子在强离心力下(超离心)按其大小和/或密度分离的方法。提供了测定大分子的质量和亚基结构的一种方法。

uncompetitive inhibition 反竞争性抑制

酶抑制作用的一种形式,在这种形式中,抑制剂和酶-底物复合物结合,降低表观 K_M 和 V_{max}。

uncoupler 解偶联剂

可使质子梯度跨膜消散而无 ATP 合成的物质,因此,电子传输的进行不伴随氧化磷酸化。

uniport 单向转运

单一分子的跨膜运动。

unsaturated fatty acid 不饱和脂肪酸

烃链中至少含有一个双键的脂肪酸。

urea cycle 尿素循环

由氨和天冬氨酸提供氨基、并联同 HCO_3^- 提供碳原子,形成尿素而排泄的催化性循环,它为蛋白质氮排泄提供了一条途径。

uridylylation 尿苷酸化

尿苷一磷酸(UMP)基团的加成作用。

uronic acid 糖醛酸

醛糖的伯醇基氧化生成羧酸基的糖。

vacuole 空泡

储藏水或其他分子的细胞内小泡。

van der Waals distance 范德华距离

二个非键合原子间的最接近的距离。

van der Waals force 范德华力

分子间的非共价缔合,源于永久性和/或诱导性偶极间的静电相互作用。

variable region 可变区

抗体分子的 N 端部分为抗原结合部位,序列高度可变性为其特征。

variant 变种

自然发生的突变体形式。

vector 载体

见 cloning vector(克隆载体)。

vesicle 小泡

充满流体、由膜包围的囊。

virulence 毒力

微生物引起疾病的能力。

virus 病毒

同化宿主细胞新陈代谢而繁殖的非生命实体。

vitamin 维生素

新陈代谢需要、动物不能合成的物质,因此必须从饮食中获得。

v_{max} 最大反应速度

酶促反应的最大速度。

v_o

酶促反应的起始速度。

W 缠绕数

见 writhing number(缠绕数)。

w 功

体系对其环境作功的热力学术语。

water of hydration 水合水

指相对不流动的水分子壳层，它包围并和溶解分子(溶质)相互作用。

weak acid 弱酸

在水溶液中仅部分电离的酸，弱酸的离解常数小于 1($pK>0$)。

Western blot Western 印迹、蛋白质印迹

见 immunoblot(免疫印迹)。

wild type 野生型

有机体或基因的天然存在形式。

wobble pairing 摆动配对

反密码子第三位置上许可的 tRNA-mRNA 配对(包括非 Watson-Crick 碱基对)，这就使许多 tRNA 可识别二个或三个不同的(简并)密码。

writhing number(*W*) 缠绕数

共价闭合的环形双螺旋 DNA 在其二重轴上环绕超螺旋轴的转数，可用于测量 DNA 的超螺旋性。

X-Ray crystallography X 射线晶体学

根据分子的晶体暴露在一束 X 射线下所产生的衍射图谱测定分子三维结构的方法。

Y

见 fractional saturation(分级饱和)。

YAC 酵母人工染色体

见 yeast artificial chromosome(酵母人工染色体)。

yeast artificial chromosome(YAC) 酵母人工染色体

指含有染色体结构的线性 DNA 分子，在酵母细胞中为正常复制和基因分离所必需。YAC 通常被用为克隆载体。

Ylid Y 盖

邻近原子上带相反电荷的分子。

zinc finger 锌指结构

一种蛋白质的结构基元，常涉及到和 DNA 的结合，为 25～60 个残基所组成，其中包括 His 和/或 Cys 残基，可和一个或二个 Zn^{2+} 四面体配位。

zonal ultracentrifugation 区带超速离心

一种制备技术，在超速离心前，将分子混合物加到预制的密度梯度表面。

Z-scheme Z 形图

表示事件(发生)的顺序和植物及蓝细菌的双光合电子中心转运系统的还原势能。

zwitterion 兼性离子

具有相反电荷基团的化合物，亦被称为偶极离子。

zymogen 酶原

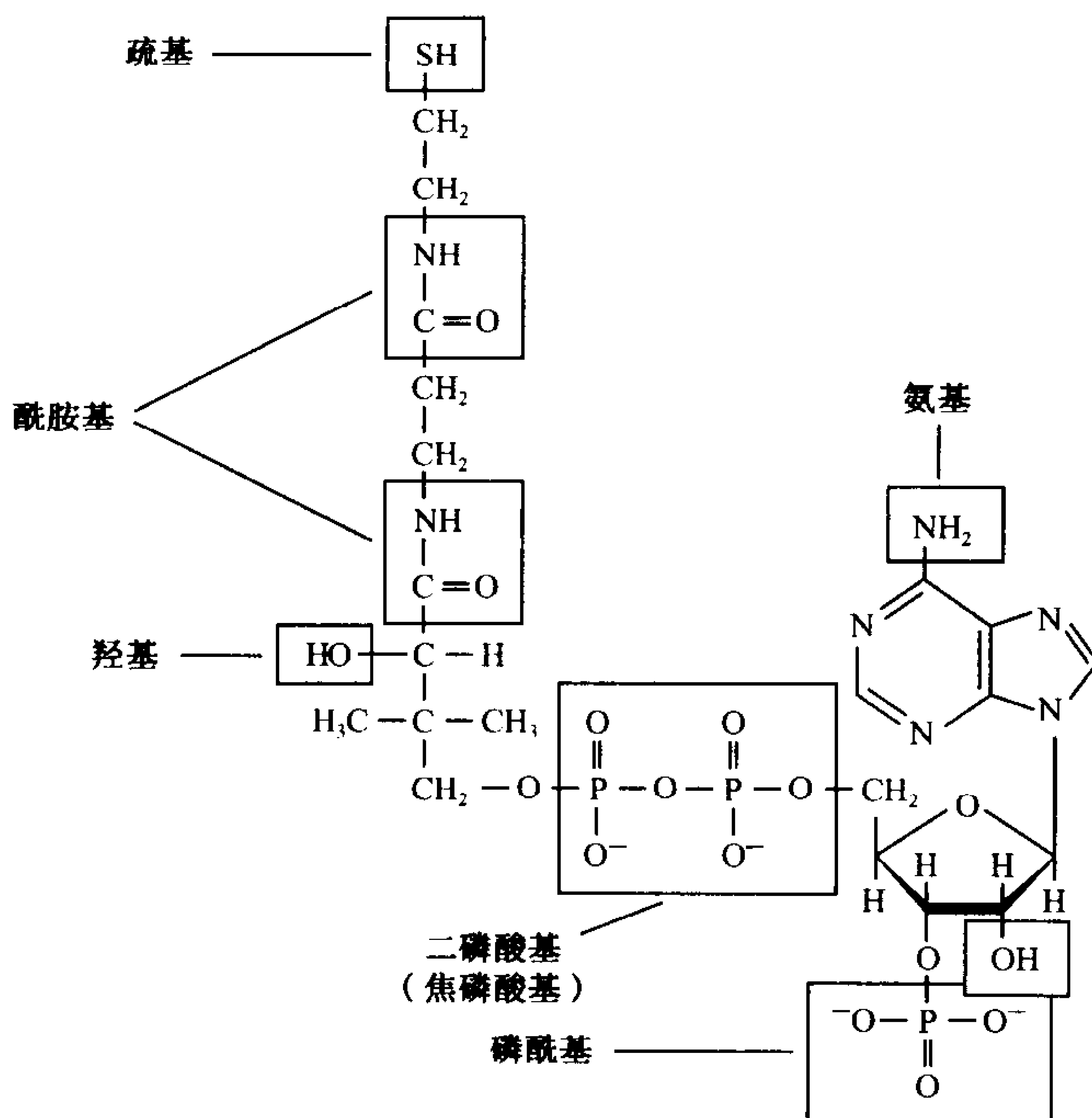
蛋白水解酶的无活性前体(proenzyme)。

(清华大学　郑昌学　刘　征　译)

问 题 解 答

第 1 章

1.



2．细胞膜必须是半透性的，允许营养物进入和废物排出，使细胞保持基本成分稳定。

3．浓度 = (摩尔数)/(体积)

体积 $= (4/3)\pi r^3 = (4/3)\pi(5\times10^{-7}\text{m})^3 = 5.24\times10^{-19}\text{m}^3 = 5.24\times10^{-16}\text{L}$

蛋白质的摩尔数 = (2 分子)/(6.022×10^{23}分子·mol^{-1}) = 3.32×10^{-24}mol

浓度 $= (3.32\times10^{-24}\text{mol})/(5.24\times10^{-16}\text{L}) = 6.3\times10^{-9}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} = 6.3\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$

4．分子数 = (摩尔浓度)(体积)(6.022×10^{23}分子·mol^{-1})

= ($10^{-3}\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)($5.24\times10^{-16}$L)($6.022\times10^{23}$分子·$\text{mol}^{-1}$)

= 3.2×10^5 分子

5．(a)液态水；(b)冰在低温下具有较小的熵值。

6．(a)减小；(b)增加；(c)增加；(d)不变。

7．(a) $T = 273 + 10 = 283\text{K}$

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

$\Delta G = 15\text{kJ} - (283\text{K})(0.05\text{kJ}\cdot\text{K}^{-1})$

$= 15\text{kJ} - 14.15\text{kJ}$

$= 0.85\text{kJ}$

$\Delta G > 0$，因此反应不能自发进行。

(b) $T = 273 + 80 = 353K$

$\Delta G = \Delta H - T\Delta S$

$\Delta G = 15kJ - (353K)(0.05kJ \cdot K^{-1})$

$= 15kJ - 17.65kJ = -2.65kJ$

$\Delta G < 0$，因此，反应是自发的。

8. $K_{eq} = e^{-\Delta G^{\circ\prime}/RT}$

$= e^{-(-20\,900J \cdot mol^{-1})/(8.314J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1})(298K)}$

$= 4.6 \times 10^3$

9. $\Delta G^{\circ\prime} = -RT\ln K_{eq} = -RT\ln[C][D]/[A][B]$

$= -(8.314J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1})(298K)\ln(3)(5)/(10)(15)$

$= 5700J \cdot mol^{-1} = 5.7kJ \cdot mol^{-1}$

由于 $\Delta G^{\circ\prime} > 0$，所以在标准状态下，该反应是吸收能量的。

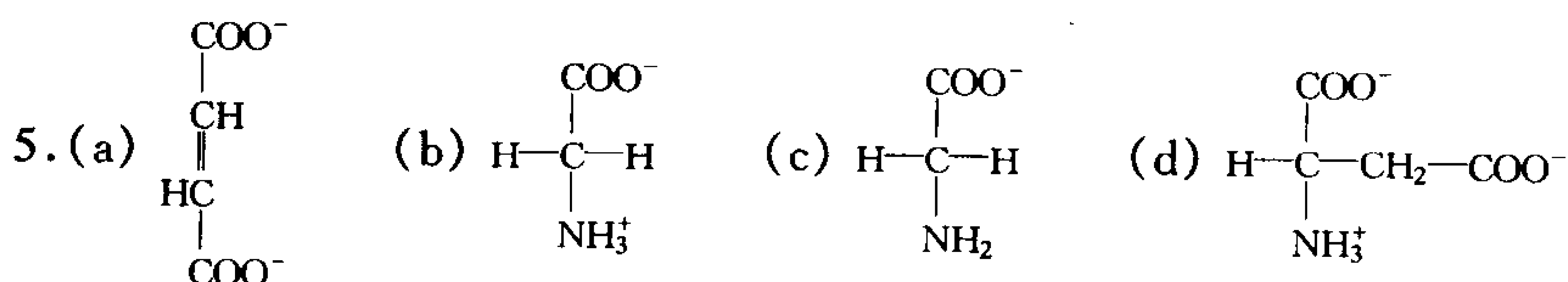
10. 由 Eq.1 - 17，$K_{eq} = [G6P]/[G1P] = e^{-\Delta G^{\circ\prime}/RT}$

$[G6P]/[G1P] = e^{-(-7100J \cdot mol^{-1})/(8.314J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1})(298K)}$

$[G6P]/[G1P] = 17.6$

$[G1P]/[G6P] = 0.057$

第2章

1. (a)供体：NH1，C2 位的 NH_2，NH9；受体：N_3，C6 位的 O，N7。(b)供体：NH1，C4 位的 NH；受体：C2 位的 O，N_3。(c)供体：NH_3^+ 基团，OH 基团；受体：COO^- 基团，OH 基团。
2. (a)水；(b)水；(c)分子束
3. 通过渗透作用，水分子从透析袋内向周围海水中运动，离子从海水中扩散进透析袋内。达到平衡时，透析袋内外的溶液组成相同。如果膜不允许溶质通过，基本上所有的水都将离开透析袋。
4. 因为这里的细菌和鱼有着相同的形状(各自的长/直径 = 6)，它们的表面积与体积之比同样与它们的长度或直径成反比(如：3μm 对 30cm)。因此，该细菌每单位体积的表面积比鱼大 100 000 倍。
5. 

6. (a)pH4，NH_4^+；pH8，NH_4^+；pH11，NH_3。

   (b)pH4，$H_2PO_4^-$；pH8，HPO_4^{2-}；pH11，HPO_4^{2-}。
7. (a)$(0.01L)(5mol \cdot L^{-1}\ NaOH)/(1L) = 0.05mol \cdot L^{-1}\ NaOH \equiv 0.05mol \cdot L^{-1}OH^-$

   $[H^+] = K_w/[OH^-] = [10^{-14}(mol \cdot L^{-1})^2]/(0.05mol \cdot L^{-1}) = 2 \times 10^{-13}mol \cdot L^{-1}$

   $pH = -\lg[H^+] = -\lg(2 \times 10^{-13}) = 12.7$

   (b)$(0.02L)(5mol \cdot L^{-1}HCl)/(1L) = 0.1mol \cdot L^{-1}\ HCl \equiv 0.1mol \cdot L^{-1}H^+$

   因为 $0.01mol \cdot L^{-1} \times 100mmol \cdot L^{-1}/(1L) = 1mmol \cdot L^{-1}$的作用，在 $0.1mol \cdot L^{-1}$HCl 存

在时，甘氨酸是不重要的。

$pH = -lg[H^+] = -lg(0.1) = 1.0$

(c) $pH = pK + lg([醋酸盐]/[醋酸])$

$[醋酸盐] = (5g)(1mol/82g)/(1^L) = 0.061mol \cdot L^{-1}$

$[醋酸] = (0.01L)(2mol \cdot L^{-1})/(1L) = 0.02mol \cdot L^{-1}$

$pH = 4.76 + lg(0.061/0.02) = 4.76 + 0.48 = 5.24$

8. 使 HA = 琥珀酸钠且 A^- = 琥珀酸二钠，$[A^-] + [HA] = 0.05mol \cdot L^{-1}$，因此，$[A^-] = 0.05mol \cdot L^{-1} - [HA]$

从方程 2-9 得，$lg([A^-]/[HA]) = pH - pK = 6.0 - 5.64 = 0.36$

$[A^-]/[HA] = 10^{0.36} = 2.29$

$(0.05mol \cdot L^{-1} - [HA])/[HA] = 2.29$

$[HA] = 0.015mol \cdot L^{-1}$

$[A^-] = 0.05mol \cdot L^{-1} - 0.015mol \cdot L^{-1} = 0.035mol \cdot L^{-1}$

琥珀酸钠的克数 $= (0.015mol \cdot L^{-1})(140g \cdot mol^{-1})/(1L) = 2.1g$

琥珀酸二钠的克数 $= (0.035mol \cdot L^{-1})(162g \cdot mol^{-1})/(1L) = 5.7g$

9. 在 pH4 时，基本上所有的磷酸都是以 $H_2PO_4^-$ 的形式存在，在 pH9 时，基本上所有磷酸都以 HPO_4^{2-} 的形式存在(图 2-6)。所以，需要的 OH^- 的浓度等于酸的浓度：$(0.1mol \cdot L^{-1}$ 磷酸$)(0.1L) = 0.01mol$

需要的 NaOH $= (0.01mol)/(1L/5mol\ NaOH) = 0.002L = 2ml$

10. (a)琥珀酸； (b)氨； (c)HEPES

第3章

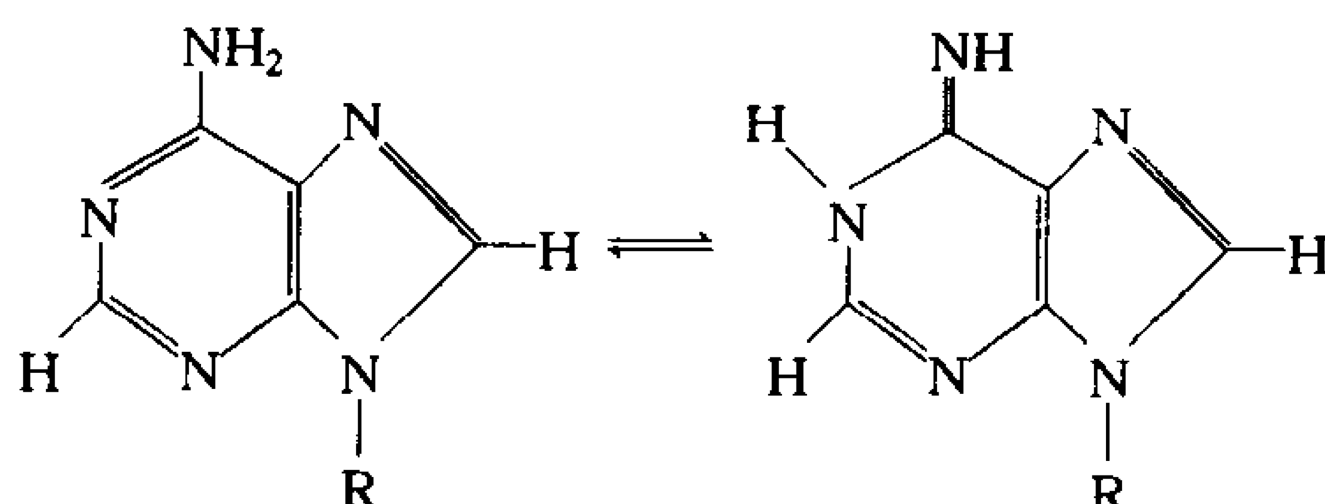
1. (a)对； (b)错； (c)错； (d)对。

2. 由于单倍染色体组(基因组)含有 21% 的 G，所以它一定含有 21% 的 C(因为 G = C)和 58% 的(A + T)(或者 29% 的 A 和 29% 的 T，因为 A = T)。每个细胞都是单倍体，且含有 900 000kb 或 9×10^7 个碱基。因此，

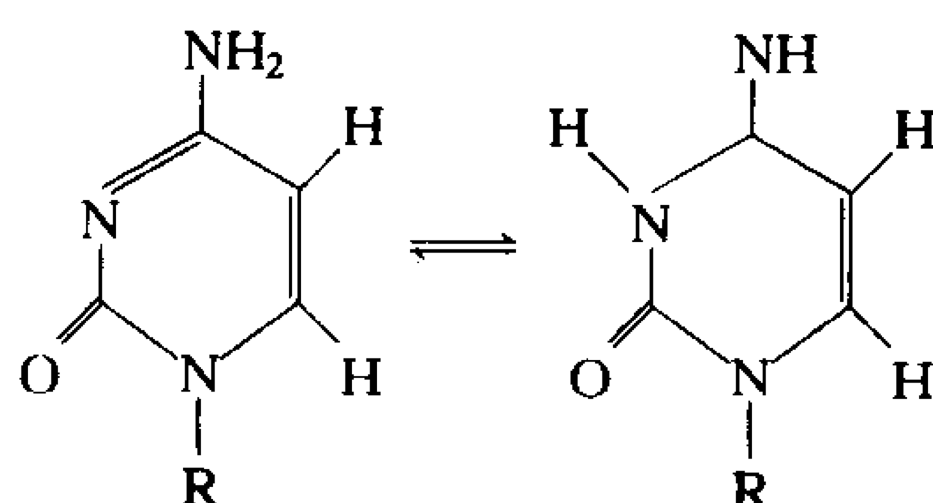
$A = T = (0.29)(9 \times 10^7) = 2.61 \times 10^7$ 个碱基

$C = G = (0.21)(9 \times 10^7) = 1.89 \times 10^7$ 个碱基

3. (a)



(b)



4. 四种不同核苷酸的可能序列数是 $4n$，这里 n 是序列中的核苷酸数。因此，(a) $4^1 = 4$，(b)

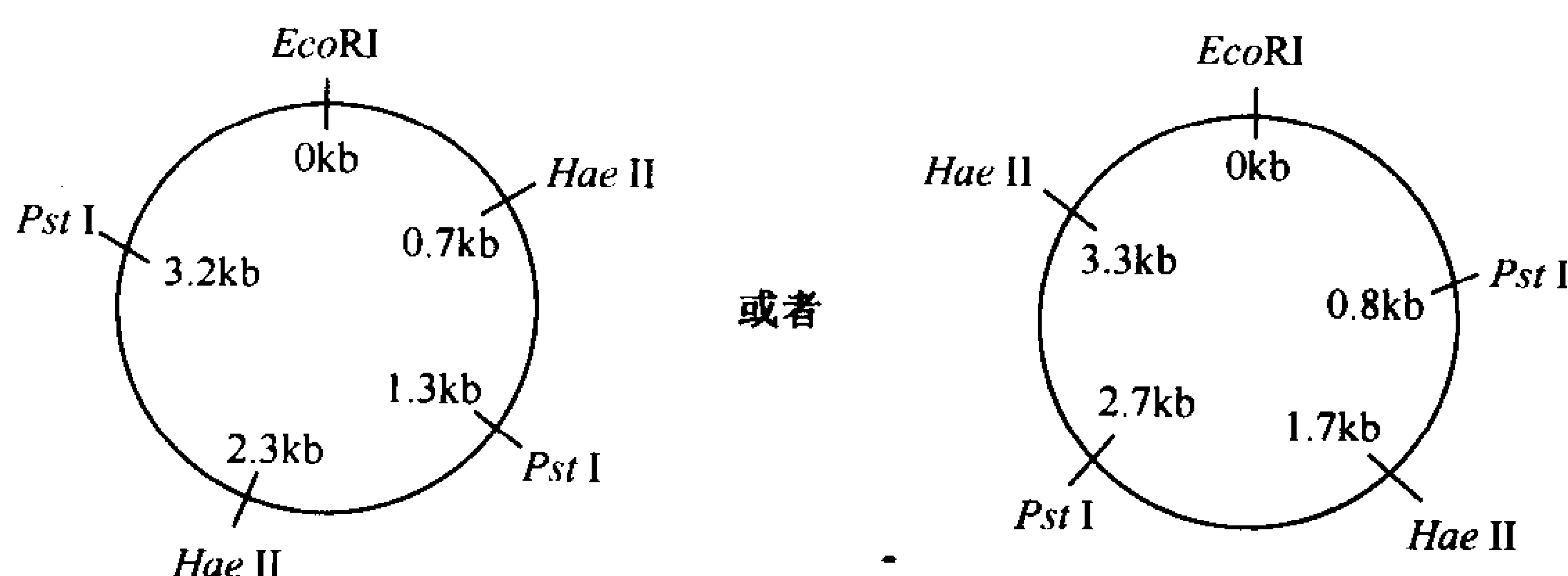
$4^2=16$,(c)$4^3=64$,(d)$4^4=256$。

5. (a)*Alu* I, *Eco*RV, *Hae*III, *Pvu* II;

 (b)*Hpa* II 和 *Msp* I;

 (c)*Bam* HI 和 *Bgl* II;*Hpa* II 和 *Taq* I;*Sal* I 和 *Xho* I。

6. 使 *Eco*RI 位点处于 0(或 4)kb 处。



7. (a)新合成的链很少被终止,因此在测序的胶中,短片段的条带表现微弱。

 (b)链终止经常发生,因此长片段就比较少。

 (c)DNA 合成的量将减少,使得胶上的条带表现微弱。

 (d)没有影响。

8. *C. elegans* 基因组(染色体组)有 100 000kb,因此

 $f=5/100\ 000=5\times10^{-5}$ 用 Eq.3-2,

 $N=\lg(1-P)/\lg(1-f)$

 $N=\lg(1-0.99)/\lg(1-5\times10^{-5})$

 $N=(-2)/(-2.17\times10^{-5})=9.21\times10^{4}$

9. 没有转化的细菌将不能在氨苄青霉素和四环素存在的条件下生长。只有转入该质粒的克隆对这两种抗生素才具有抗性。而含有插入片段的质粒对氨苄青霉素敏感,但对四环素表现抗性。

10. (a)仅仅能得到的是从引物延伸的不同长度的单链 DNA。这些单链 DNA 的数目将随着循环的次数线性增加,而不是以指数形式增加。

 (b)PCR 产生的是 DNA 片段的混合物。这些片段的长度相当于具有单个结合位点引物的位置,和多特异性引物不同结合位点的位置之间的距离。

 (c)PCR 的第一个循环仅生成与原 DNA 链互补的新链,这是因为当模板被打破时,DNA 的合成不能进行。然而,由于新链具有与打破的链同样的序列,因此 PCR 从第二个循环能继续正常进行下去。

 (d)DNA 的合成在 PCR 的第一个循环受到破坏时将终止。

11. ATAGGCATAGGC 和 CTGACCAGCGCC。

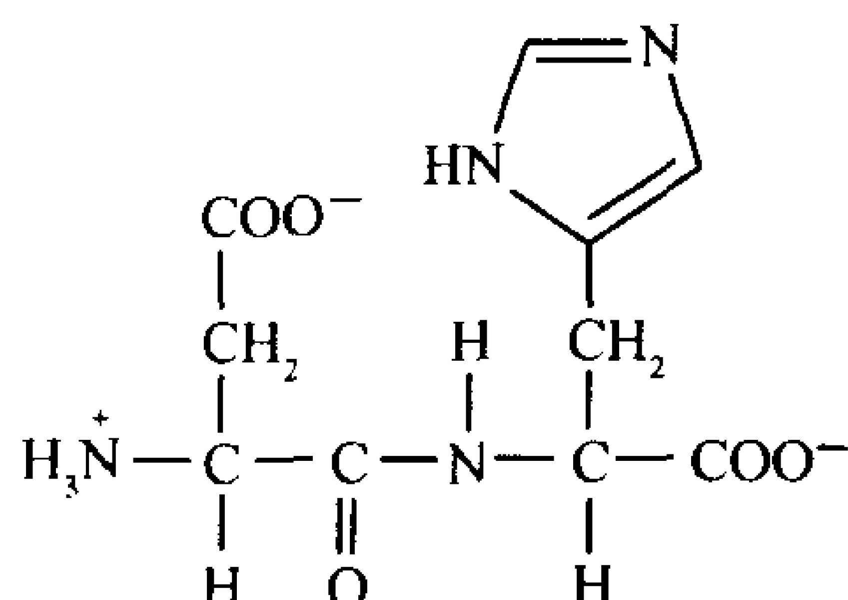
第 4 章

1. 苏氨酸和丝氨酸;缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸;天冬酰胺和谷氨酰胺;天冬氨酸和谷氨酸。

2. 氢键供体:α-氨基,酰胺氮。

氢键受体：α-羧基，酰胺羰基

3.



4. $N=5\times4\times3\times2\times1=120$

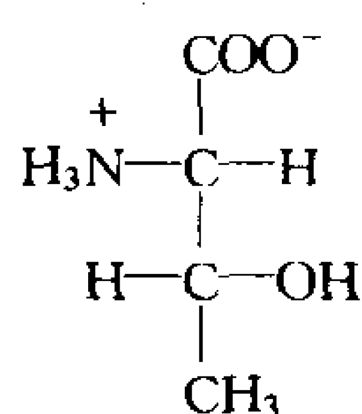
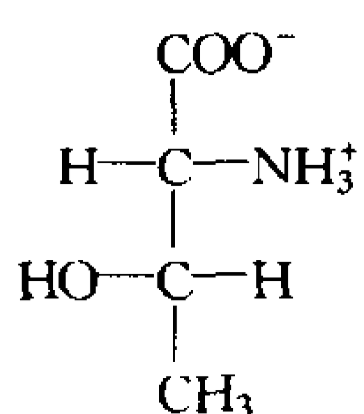
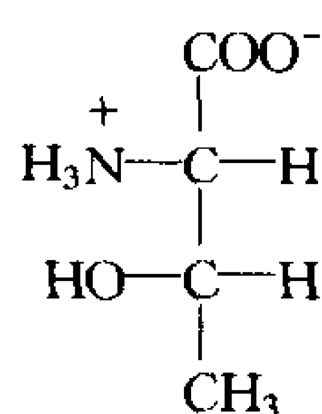
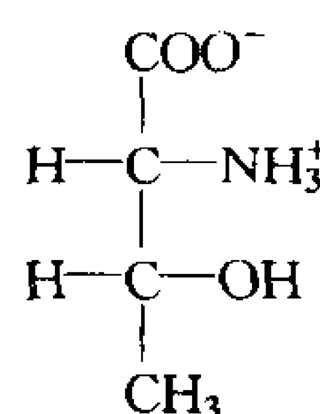
5. (a) +1；(b) 0；(c) −1；(d) −2

6. (a) $pI=(2.35+9.87)/2=6.11$

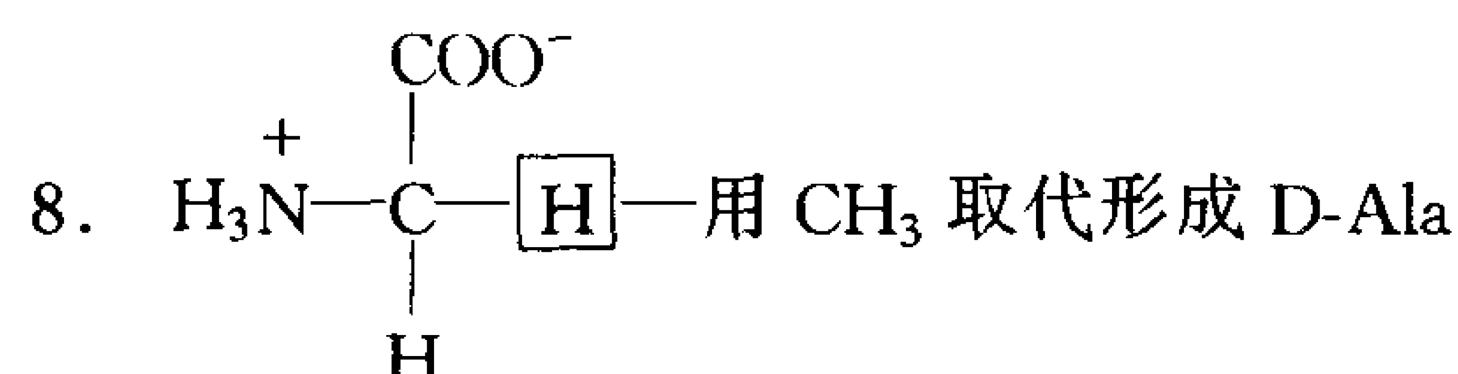
(b) $pI=(6.04+9.33)/2=7.68$

(c) $pI=(2.10+4.07)/2=3.08$

7.

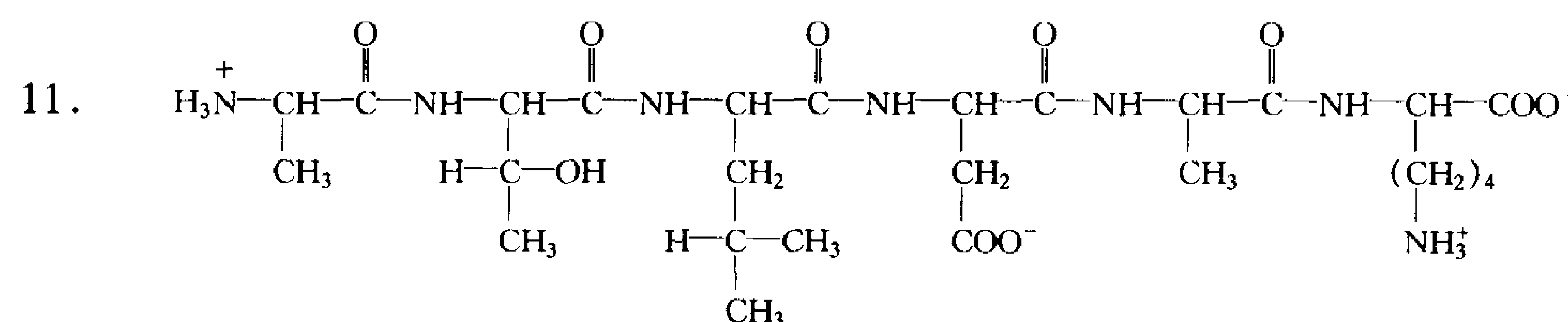
8.



9. (2S,3S)-异亮氨酸

10. (a)丝氨酸（N-乙酰丝氨酸；(b)赖氨酸（5-羟基赖氨酸）；(c)甲硫氨酸（N-甲酰甲硫氨酸）。

11.



(a) 表4-1中可电离侧链的pK值是3.90(Asp)和10.54(Lys)；假定C端的赖氨酸羧基的pK为3.5，而N端的丙氨酸氨基的pK为8.0(节4-1D)。pI约为涉及中性形式的两个可电离基团的pK值的中间值(即Asp的pK值和N端Ala的pK值)：

$$pI\approx1/2\times(3.90+8.0)\approx5.95$$

(b) pH7.0时的净电荷是零。

12. 鸭胰岛素A8是谷氨酸残基而人是苏氨酸残基。因为谷氨酸在生理pH时带负电荷，苏氨酸为中性，因此人胰岛素比鸭胰岛素pI要高。

第5章

1. (a) Leu, His, Arg；(b) Lys, Val, Glu

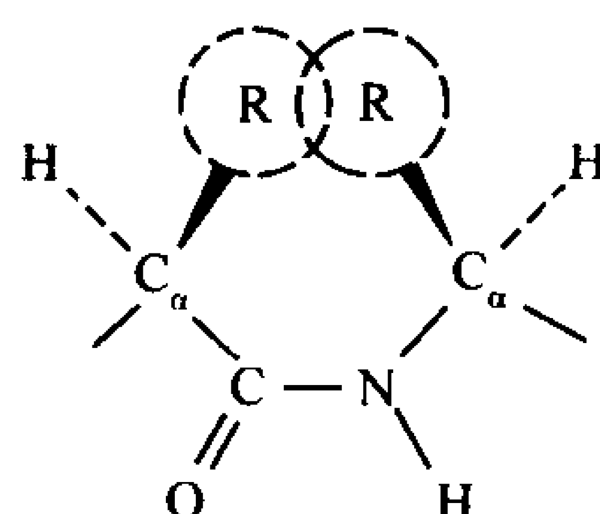
2. 肽 B,因为它含有比较多的 Trp(色氨酸)和其他芳香族残基。
3. 该蛋白具有长链形状,因此在凝胶过滤时表现出大蛋白的特性。由于表面包有变性剂 SDS 的蛋白质的迁移率仅和它的大小有关,所以用 SDS-PAGE 测定它的分子质量更准确。
4. 这个蛋白质含有 2 个 60kDa 的多肽和两个 40kDa 的多肽,每个 40kDa 的肽链通过二硫键与一个 60kDa 的肽链相连接,两个 100kDa 的单体通过非共价键结合形成一个 200kDa 分子质量的蛋白质。
5. 在高盐浓度下,蛋白质发生凝聚。
6. 丹磺酰氯能与起始的氨基集团反应,包括赖氨酸(Lys)残基上的 ε-氨基集团。
7. (a)Gly;(b)Thr;(c)无(它的 N 端氨基集团被乙酰化,因此不能与 Edman 试剂反应。
8. Asp—Met—Leu—Phe—Met—Arg—Ala—Tyr—Gly—Asn。
9. Ala—Val—Cys—Arg—Thr—Gly—Cys—Lys—Asn—Phe—Leu

Tyr—Lys—Cys—Phe—Arg—His—Thr—Lys—Cys—Ser

10. 用过甲酸使二硫键氧化裂解时,也使 Met(蛋氨酸)残基发生氧化,而用 CNBr 产生的裂解反应,对他们不发生干扰。由于这是蛋白质序列分析的主要步骤之一,因此氧化裂解很少被采用。
11. 因为蛋白质 1 含有的疏水氨基酸残基(Ala, Ile, Pro, Val)的比率比蛋白质 2 和 3 多,所以,采用疏水层析能将其分离出来。
12. Arg—Ile—Pro—Lys—Cys—Arg—Lys—Phe—Gln—Gln—Ala—Gln—His—Leu—Arg—Ala—Cys—Gln—Gln—Trp—Leu—His—Lys—Gln—Ala—Asn—Gln—Ser—Gly—Gly—Gly—Pro—Ser

第 6 章

1.



2. (a)3.6_{13};(b)螺旋更陡
3. 100 残基×(1 圈/3.6 个残基)×(5.1Å/角蛋白圈)=142Å
4. 是
5. (a) Gln; (b) Ser; (c) Ile; (d) Cys
6. βαβαβααβαβββαββαββαββββα
7. (a) C_4, D_2

   (b) C_6, D_3
8. 不能
9. 疏水效应,范德华作用和氢键在变性过程中被破坏,共价交联得以保留。

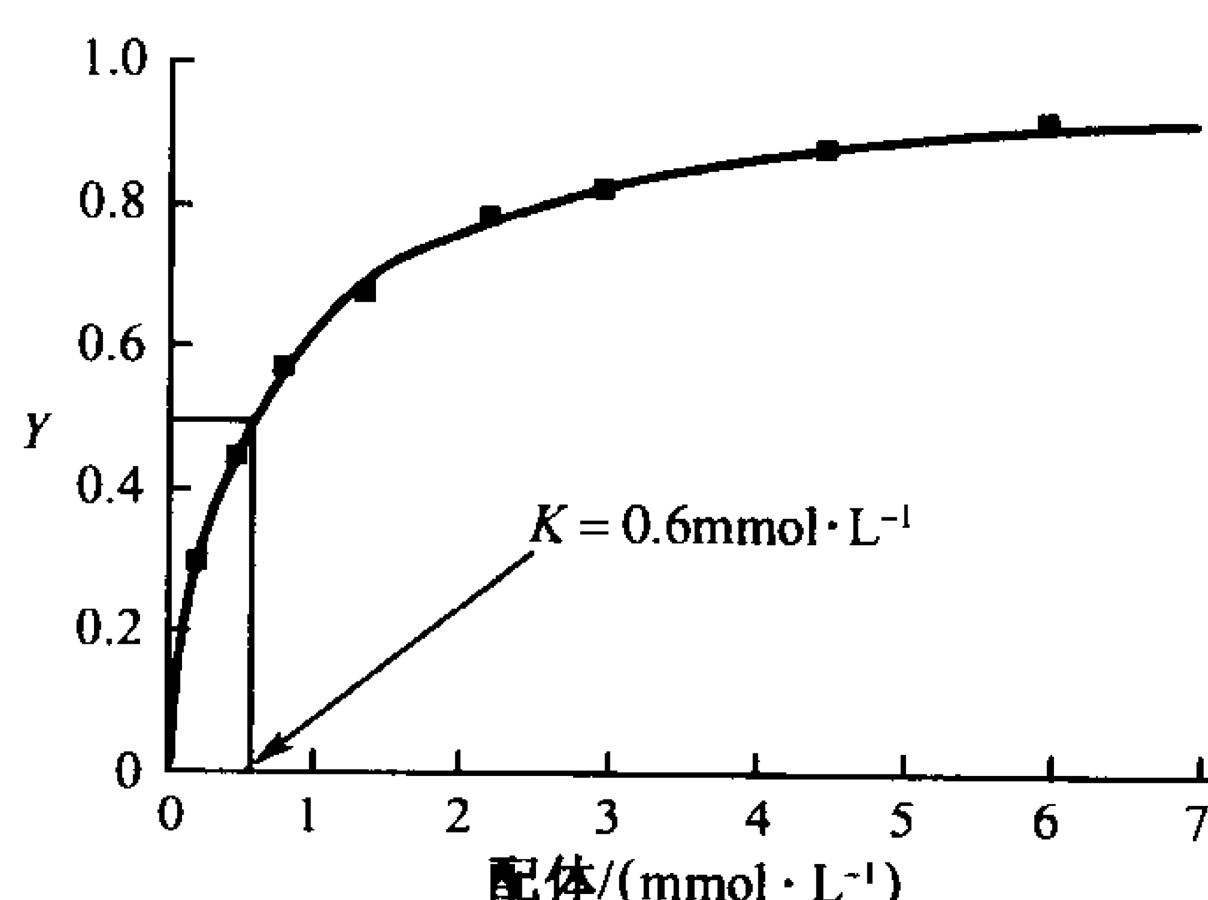
10. 生理条件下，带正电荷的 Lys 侧链相互排斥，当 pH 值升高到大于 $pK(>10.5)$ 时，将中和侧链，允许形成 α 螺旋。

11. O_2 分子质量为 32Da，血红蛋白与 4 个氧分子的质量比等于对应的体积比，$65\,000/(4\times32)=508$。70kg 体重的职员体积为 $70kg\times1cm^3/g\times(1000g/kg)\times(1m/100cm)^3=0.07cm^3$，则办公室与职员体积比为 $(4\times4\times3)/0.070=686$。两个比率具有相同的量级，你可能没想到这样的结果。

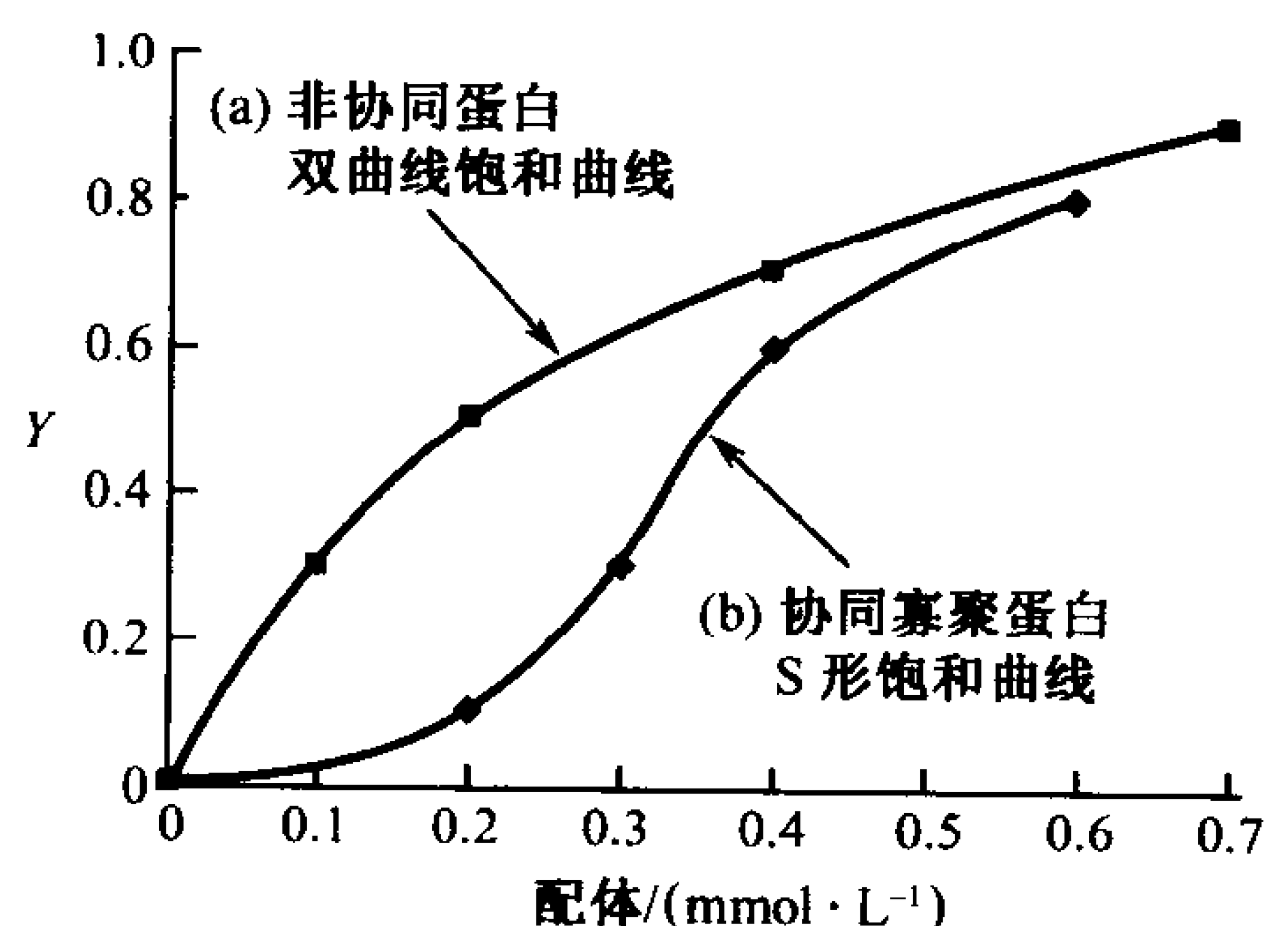
12. 多肽 c 最可能形成 α 螺旋，其 3 个荷电残基(Lys、Glu、Arg)在螺旋的同侧对齐。多肽 a 相邻的碱性残基(Arg 和 Lys)将使 α 螺旋不稳定。多肽 b 含 Gly 和 Pro，两者都破坏螺旋(表 6-1)，也阻碍 β 折叠股的形成，所以多肽 b 最不可能形成 β 折叠股。

第 7 章

1.



2. b 描述的 S 形结合曲线表现出配体与寡聚蛋白协同结合特征。



3. (a)低，(b)高。由于血红蛋白 Yakima 的 Asp99β→His 突变破坏了 T 态的 α1→β2 界面中的键，T ⇌ R 平衡向 R 态漂移(较低的 p_{50})。血红蛋白 Kansas 的 Asn102β→Thr 突变通过破坏 R 态键，T ⇌ R 平衡向相反方向(T 态)漂移。

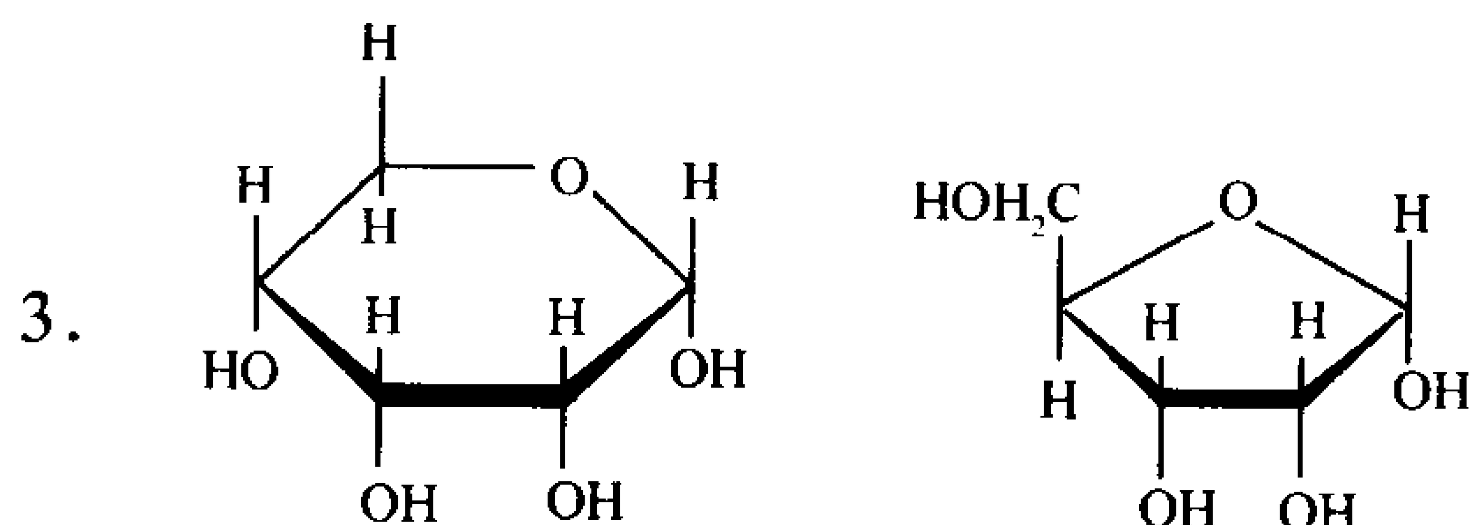
4. 增加的 BPG 有助于维持红细胞将 O2 转运到组织。然而 BPG 使血红蛋白的 T 构象稳定，所以它促进红细胞镰刀(型)化并使疾病加重。

5. 当鳄鱼不呼吸呆在水下时，鳄鱼代谢产生 CO_2，因此它的血液中的 HCO_3^- 含量增加。HCO_3^- 优先与鳄鱼的脱氧血红蛋白结合，别构效应促进血红蛋白迅速转向脱氧构象，因此可释放转运来的 O_2。这有助于鳄鱼可在水下呆足够长时间以便于捕食。

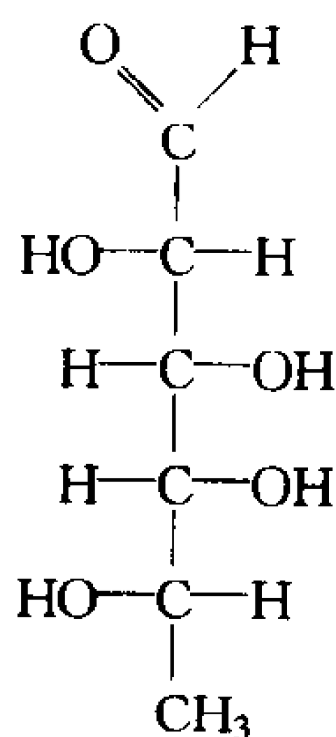
6. 由于许多肌球蛋白头部与沿着粗丝重叠的细丝结合，肌球蛋白分子不能同时实施牵拉，所以粗肌丝和细肌丝在单个肌球蛋白分子的牵拉间隔相向移动的距离应当大于 60Å。
7. 在缺少 ATP 时，每个肌球蛋白头部处于低能构型，不能释放它结合的肌动蛋白分子。因此粗丝和细丝形成一个刚性的、交联的阵列。
8. (a)150～200kDa；(b)150～200kDa；(c)～23kDa 和 53～75kDa
9. 该环位于结构域的表面，所以它允许比较多的氨基酸取代。β 折叠片中的氨基酸改变有可能使得结构域不稳定。
10. 天然蛋白中的抗原部位通常由几个肽段组成，但当蛋白质的三级结构被破坏时，这些片段就不再相邻了。
11. (a)Fab 片段是单价的，因此不能与抗原交联产生沉淀。(b)小的抗原只有一个抗原部位，因此不能结合更多的抗体产生沉淀。(c)当抗体过多时，与抗原结合的大多数抗体每个免舆球蛋白分子只结合一个抗原。当抗原过多时，大多数免疫球蛋白可以结合两个单独的抗原。

第 8 章

1. (a)4；(b)8；(c)16
2. (a)和(d)
3.



4. (a)有；(b)无(其对称的两半部是可重叠的)；(c)无
5. L-岩藻糖是 L-半乳糖的脱氧形式。



L-岩藻糖

6. α-D-葡萄糖-(1→1)-α-D-葡萄糖或者 α-D-葡萄糖-(1→1)-β-D-葡萄糖。
7. 19
8. 一个
9. 直链淀粉(它只有一个非还原端，由此葡萄糖能被迁移)
10. －200

第9章

1. 反式油酸熔点高,因为固态它的碳氢链靠在一起比顺式油酸更紧密。
2. 可在 C1 和 C3 处发生取代的 $4\times4=16$ 对脂肪酸残基中只有 10 对是惟一的,因为 C1 和 C3 处不同取代基与取代次序相反的该分子是一致的。然而,C2 处可以是 4 种脂肪酸中的任何一个,所以应当有 $4\times10=40$ 个不同的三酰甘油。
3. 含有硬脂酸的三酰甘油产生更多的能量,因为它被完全还原了。
4. (a)棕榈酸和 2-油酰-3-磷脂酰丝氨酸;
   (b)油酸和 1-棕榈酰-3-磷脂酰丝氨酸;
   (c)磷酸丝氨酸和 1-棕榈酰-2-油酰-甘油;
   (d)丝氨酸和 1-棕榈酰-2-油酰-磷脂酸
5. 不同,"头部"的脂酰链埋在双层膜的内部,露出二磷酸甘油的头部。
6. 类固醇激素是疏水性的,可以扩散过细胞膜到达它的受体。
7. 由花生四烯酸合成的类花生酸是细胞内通讯所必需的。培养的细胞不需要这样的通讯,因此不需要亚油酸。
8. 三酰甘油缺少极性头部,所以它们本身不能排列在带有脂酰链的朝内的双层膜中。
9. 神经节苷脂中的大的寡糖头部妨碍脂双层中脂的有效堆积。
10. (a)饱和的;(b)长链;通过增加它的饱和的长链脂肪酸的比例,使得它具有较高的熔点,在高温下该细菌可以维持恒定的膜流动性。

第10章

1. (a)一圈 5.4Å,30Å 需 5.6 圈。
   (b)一圈 3.6 个残基,5.6 圈需 20 个残基。
   (c)当脂头部基团不能提供氢键配对时,额外的残基形成 α 螺旋,部分满足了主链氢键形成的需要。
2. 不行,虽然 β 折叠能跨越脂双层,单股 β 折叠不稳定。因为它的主链不能形成氢键。
3. (a)内层;(b)外层。见图 10-17。
4. (a)细胞内外都有标记。(b)仅细胞外被标记。(c)仅细胞内部被标记。
5. 突变的信号肽酶在信号肽内会切断许多前蛋白,这些蛋白通常具有 Leu-Leu 序列。因为信号肽酶是在信号肽进入内质网腔后才发生作用,因此并不影响转位进入内质网。缺少 Leu-Leu 序列的蛋白质保持它们的信号肽,这些蛋白质和那些被异常切割其信号序列的蛋白质很有可能不规则地折叠,从而导致功能异常。
6. (a)非介导性转运;(b)介导性转运;(c)非介导性转运;(d)介导性转运。
7. (a)

$$\begin{aligned}\Delta\overline{G} &= RT\ \ln([\mathrm{Na^+}]_{内}/[\mathrm{Na^+}]_{外})\\ &= (8.314\mathrm{J\cdot K^{-1}\cdot mol^{-1}})(310\mathrm{K})(\ln[10\mathrm{mmol\cdot L^{-1}}/150\mathrm{mmol\cdot L^{-1}}])\\ &= (8.314)(310)(-2.71)\mathrm{J\cdot mol^{-1}}\\ &= -6980\mathrm{J\cdot mol^{-1}}\\ &= -7.0\mathrm{kJ\cdot mol^{-1}}\end{aligned}$$

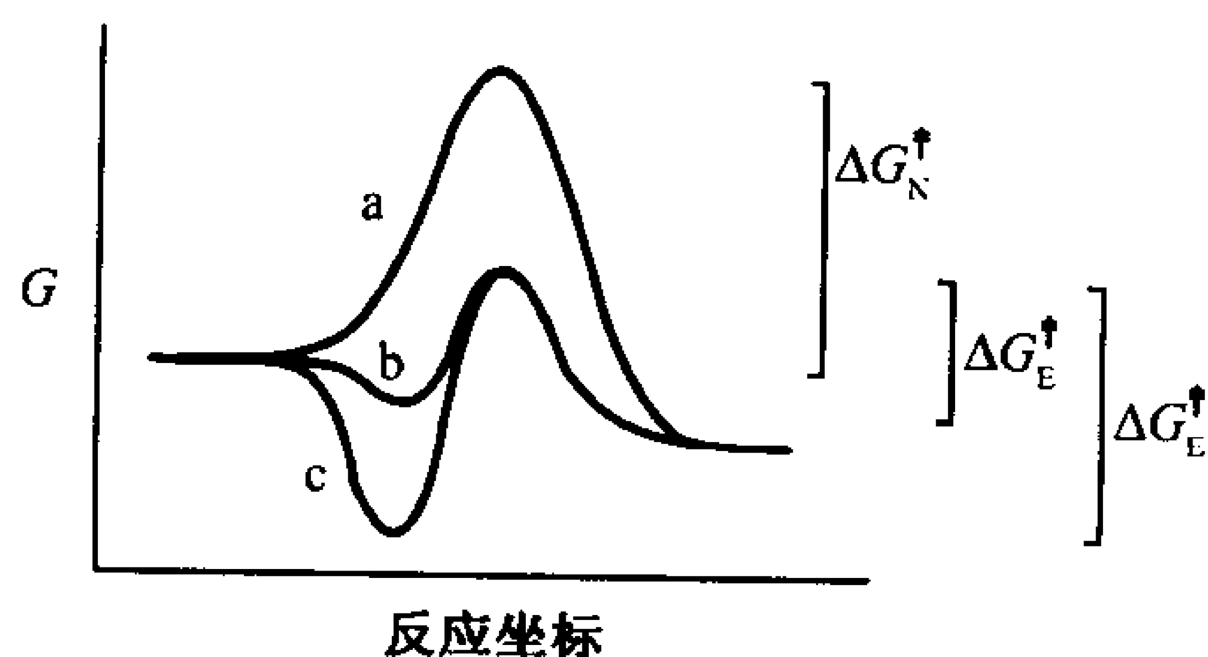
(b)

$$\Delta \overline{G} = RT\ \ln([\text{Na}^+]_{内}/[\text{Na}^+]_{外}) + Z_A\mathscr{F}\Delta\psi$$
$$= -6980 + (1)(96\,485\text{C}\cdot\text{mol}^{-1})(-0.06\text{J}\cdot\text{C}^{-1})$$
$$= -6980\text{J}\cdot\text{mol}^{-1} - 5790\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$$
$$= -12770\text{J}\cdot\text{mol}^{-1}$$
$$= -12.8\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

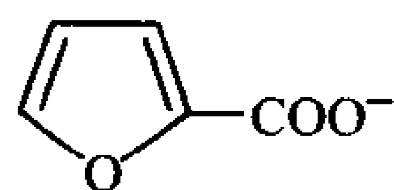
8. (a)Na^+转运停止，因为当脂在凝胶状态被固定化，离子载体-Na^+复合物不能穿膜扩散。
   (b)不行，未封闭的N端是质子化的氨基，会排斥另一个短杆菌肽A的N端，而不是和它形成氢键。这样就不可能掩埋脂双层的疏水内核。
9. 要被转运的离子数为$(10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1})(100\mu\text{m}^3)(N) = (0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})(10^{-13}\text{L})\cdot(6.02\times 10^{23}$离子$\cdot\text{mol}^{-1}) = 6.02\times10^8$ 个离子
   因为有100个离子载体，每一个载体必须转运6.02×10^6个离子，因此所需时间为$(6.02\times10^6$ 个离子$)(1\text{s}/10^4$ 个离子$) = 602\text{s} = 10\text{min}$
10. 没有ATP，$(Na^+\text{-}K^+)$-ATPase停止排出Na^+，因此不再有葡萄糖通过Na^+-葡萄糖协同转运进入细胞。在细胞中的葡萄糖然后通过被动介导性葡萄糖转运蛋白被排出，细胞内葡萄糖浓度减少，直至和细胞外的葡萄糖浓度相当。（当然，在这种情况发生之前，细胞很可能因渗透压而胀裂。）
11. 葡萄糖运入周细胞的双曲线表明，这是一个蛋白质介导的钠依赖性过程。转运蛋白有钠离子的结合位点，在低钠离子浓度下，葡萄糖转运直接和钠离子浓度成正比。然而在高浓度钠离子下，转运蛋白上所有的钠离子结合位点均被占有，因此葡萄糖转运达到最大速度。葡萄糖运入内皮细胞并不是钠依赖性的，转运的高速率与钠的存在与否无关。图中提供的信息还不足以确定葡萄糖运入内皮细胞是否是蛋白质介导性的。
12. 在pH5时迅速转运，说明转运过程涉及氢离子。一种可能性是乳酸和氢离子协同转运。在pH5时H^+浓度(原文为Ca^{2+})是pH8时的1000倍。第二种可能性是乳酸以质子化形式被转运，在pH5时，乳酸质子化百分比较高。另外一种可能性是参与乳酸转运的转运蛋白质的氨基酸侧链在pH5时质子化，而在pH8时未质子化。

第11章

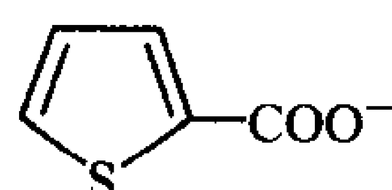
1. (a)异构酶(丙氨酸消旋酶)；(b)裂解酶(丙酮酸脱羧酶)；(c)氧化还原酶(乳酸脱氢酶)；(d)连接酶(谷氨酰胺合成酶)
2. S与酶结合越牢，$\Delta G_E^{\ddagger}$的值越大。随着$\Delta G_E^{\ddagger}$接近$\Delta G_N^{\ddagger}$，酶催化反应的速率将接近非酶催化的速率。



3. Glu 在离子化状态时其 p*K* 大约为 4，其作用为碱性催化。而 Lys 在质子状态时，其 p*K* 大约为 10，其作用为酸性催化。
4. 酶的活性形式中含有巯基阴离子，所增加的 p*K* 值将增加巯基的亲核性，同时也增加了由酶的活性形式引起的反应催化速率。然而，处于活性状态的酶的数量取决于溶液的 pH。
5. DNA 缺少生成 2′，3′-环形反应中间产物所需要的 2′-OH 基团。
6.

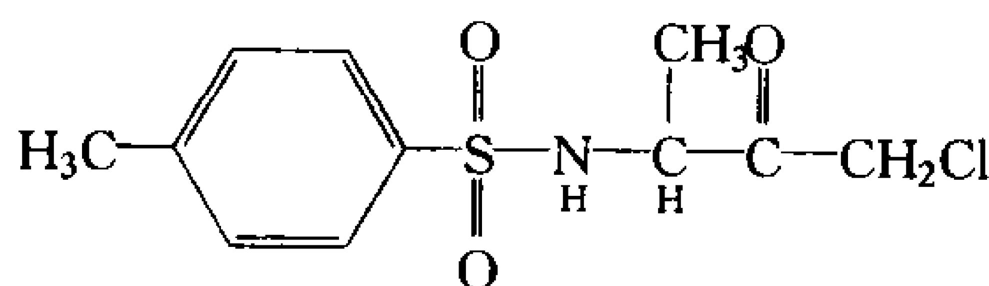


2-羟甲基-呋喃

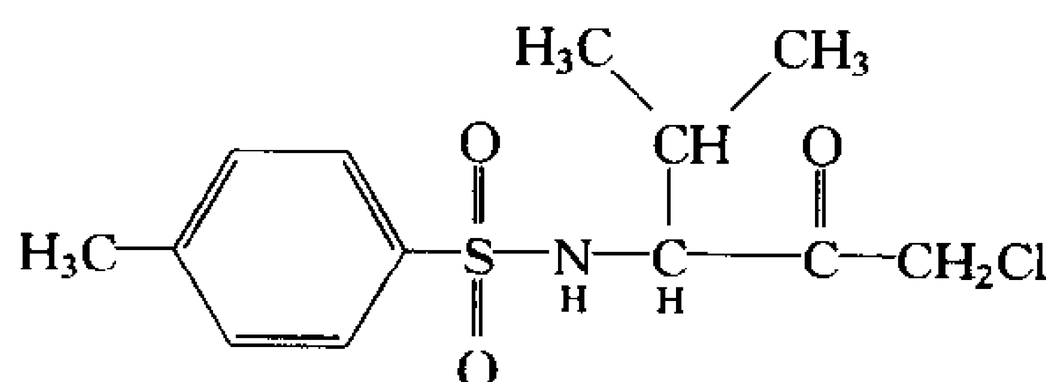


2-羟甲基-噻吩

7. 过渡态的优先与酶结合是酶催化机理中一个重要的部分，它常常是最重要的，因此底物结合位点即为催化位点。
8. 溶菌酶的活性位点排列是为切割多糖的第四和第五个残基之间的键，由于溶菌酶活性位点可以束缚至少 6 个单糖单元，$(NAG)_6$ 比 $(NAG)_4$ 与酶的结合更紧密，它附加的结合自由能可以使 D 环变成半椅式结构，从而加速了反应。
9. Asp 101 和 Arg 114 与底物分子(图 11-17)形成了氢键，Ala 不能与底物分子形成氢键，因此替代的酶只有很少的活性。
10.



甲苯磺酰基-L-丙氨酸氯甲基酮



甲苯磺酰基-L-缬氨酸氯甲基酮

11. 枯草杆菌蛋白酶和胰凝乳蛋白酶一般来说是没有联系的，这表明它们的活性位点的几何构型来自于趋同进化。假定这个进化对催化有效性是适宜的，那么催化基团只有一种适宜的排列。枯草杆菌蛋白酶和胰凝乳蛋白酶之间的任何类似必须在催化上是有意义的，反过来说，它们之间任何的不同，不大可能具有催化的重要性。
12. (a)很少或没有影响。
    (b)催化一定是很低的，因为变异干扰了催化三联体的功能。
13. 大豆胰蛋白酶抑止剂不能从豆腐中去除，它在肠中抑制了胰蛋白酶，致使蛋白不消化而使食物中的营养值减少了，它也会导致肠子不舒服。
14. 活化胰蛋白酶原和胰凝乳蛋白酶原被切割的肽键其前面的阳离子残基对胰蛋白酶，而不是胰凝乳蛋白酶专一，因而，是胰蛋白酶，而不是胰凝乳蛋白酶可以活化这些酶原。

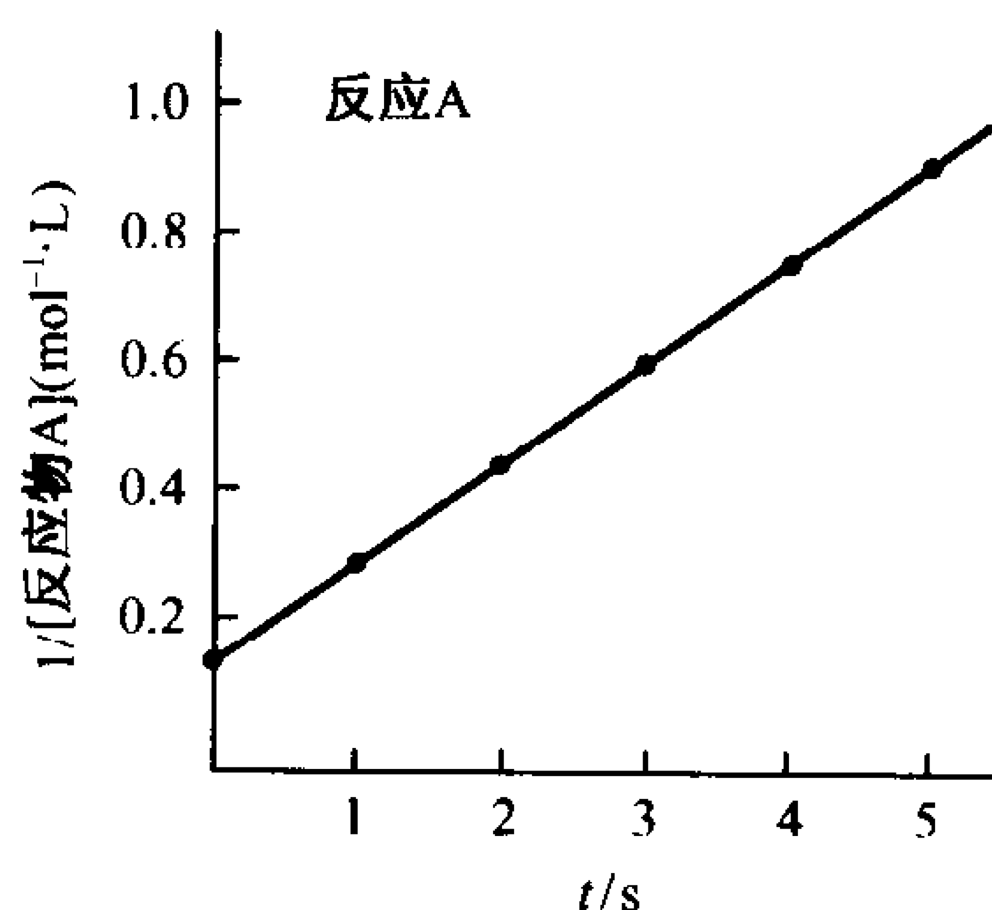
第 12 章

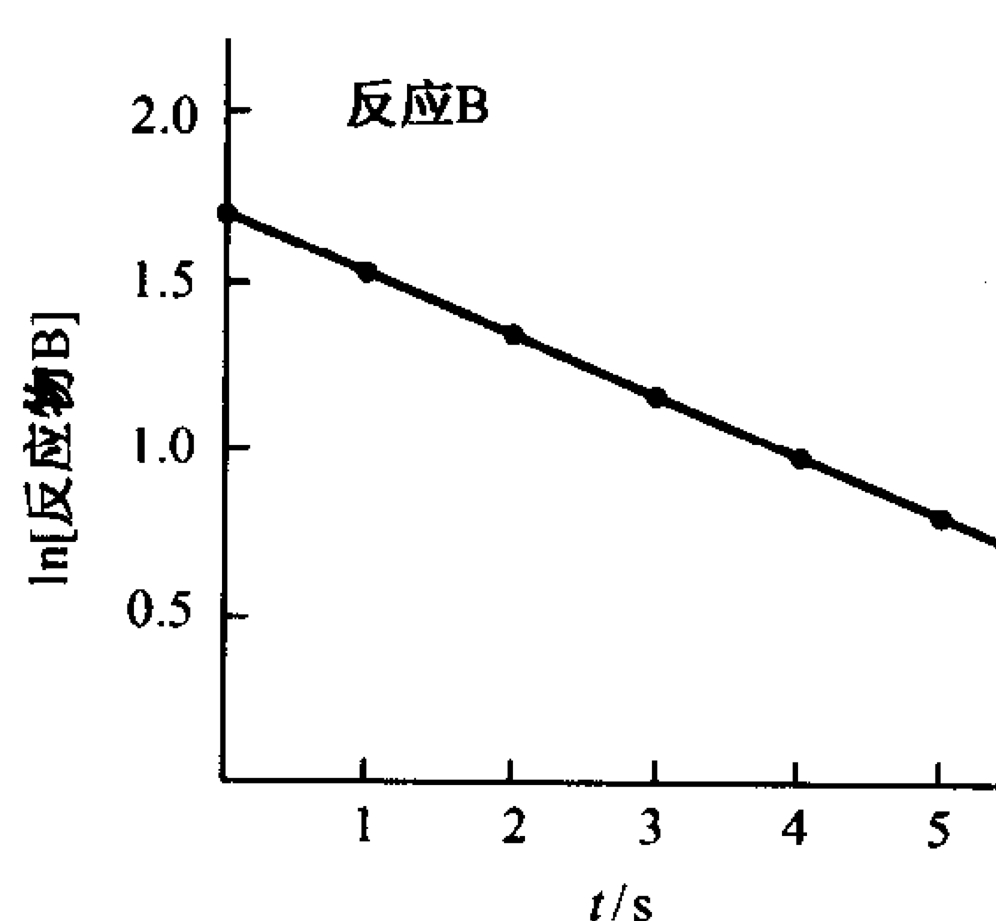
1. 由方程 12-7, $[A]=[A]_0 e^{-kt}$, 既然 $t_{1/2}=0.693/k$, $k=0.693/14d=0.05d^{-1}$

   (a) $7\mu mol$ (b) $5\mu mol$ (c) $3.5\mu mol$ (d) $0.3\mu mol$

2. 对反应 A, 只有 1/[反应物]对 t 作图为直线, 所以该反应是二级反应, 斜率 k 为 $0.15mmol \cdot L^{-1} \cdot S^{-1}$。对反应 B, 只有 ln[反应物]对 t 作图给出直线, 所以为一级反应, 斜率的负数 k 为 $0.17s^{-1}$。

时间/s	反应 A 1/[反应物]($mmol \cdot L^{-1}$)	反应 B ln[反应物]
0	0.16	1.69
1	0.32	1.53
2	0.48	1.36
3	0.62	1.16
4	0.78	0.99
5	0.91	0.83





3. $v_0 = V_{max}[S]/(K_m+[S])$

   $v_0/V_{max}=[S]/(K_m+[S])$

   $0.95=[S]/(K_m+[S])$

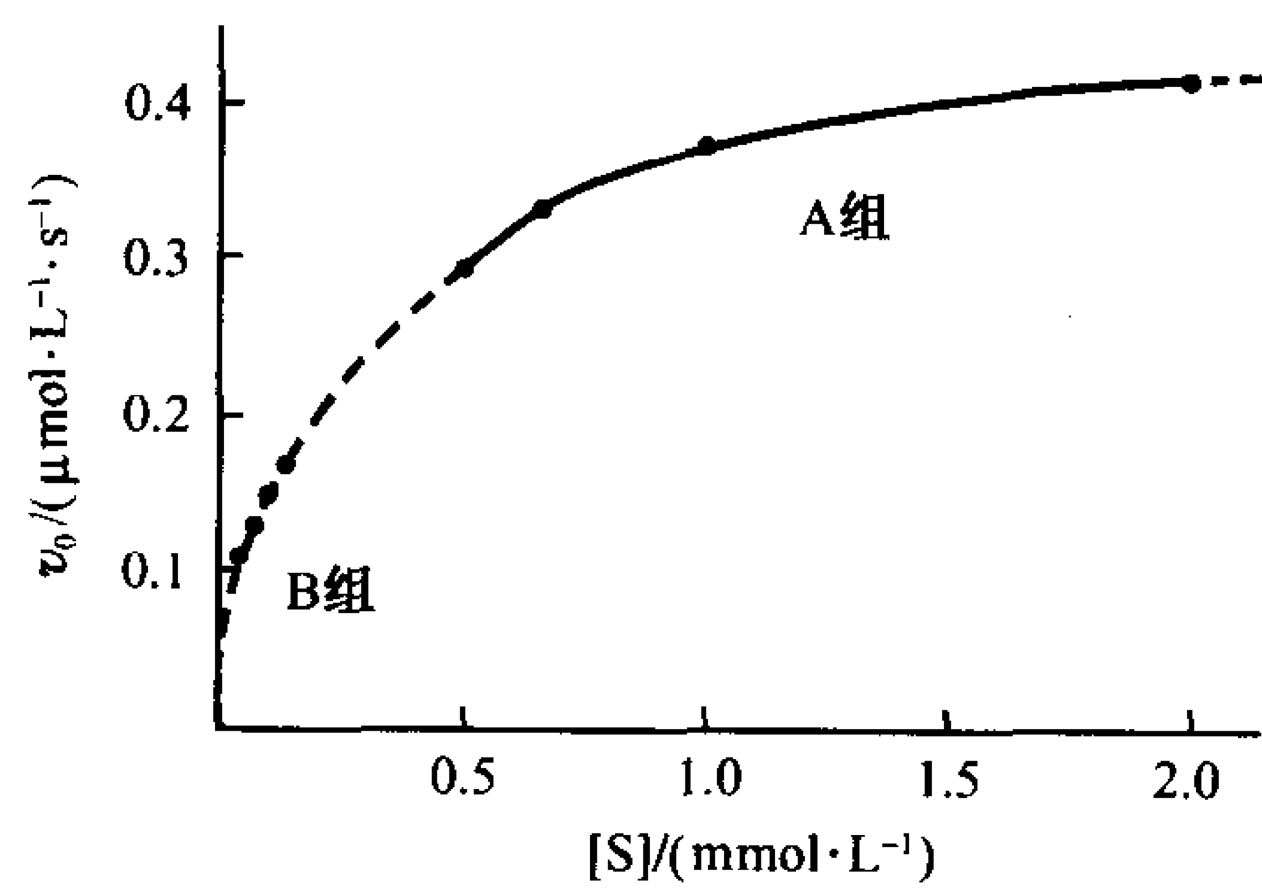
   $[S]=0.95K_m+0.95[S]$

   $[S]=(0.95/0.05)K_M=19K_M$

4. 乙酰胆碱酯酶, 碳酸酐酶, 过氧化氢酶, 延胡索酸酶

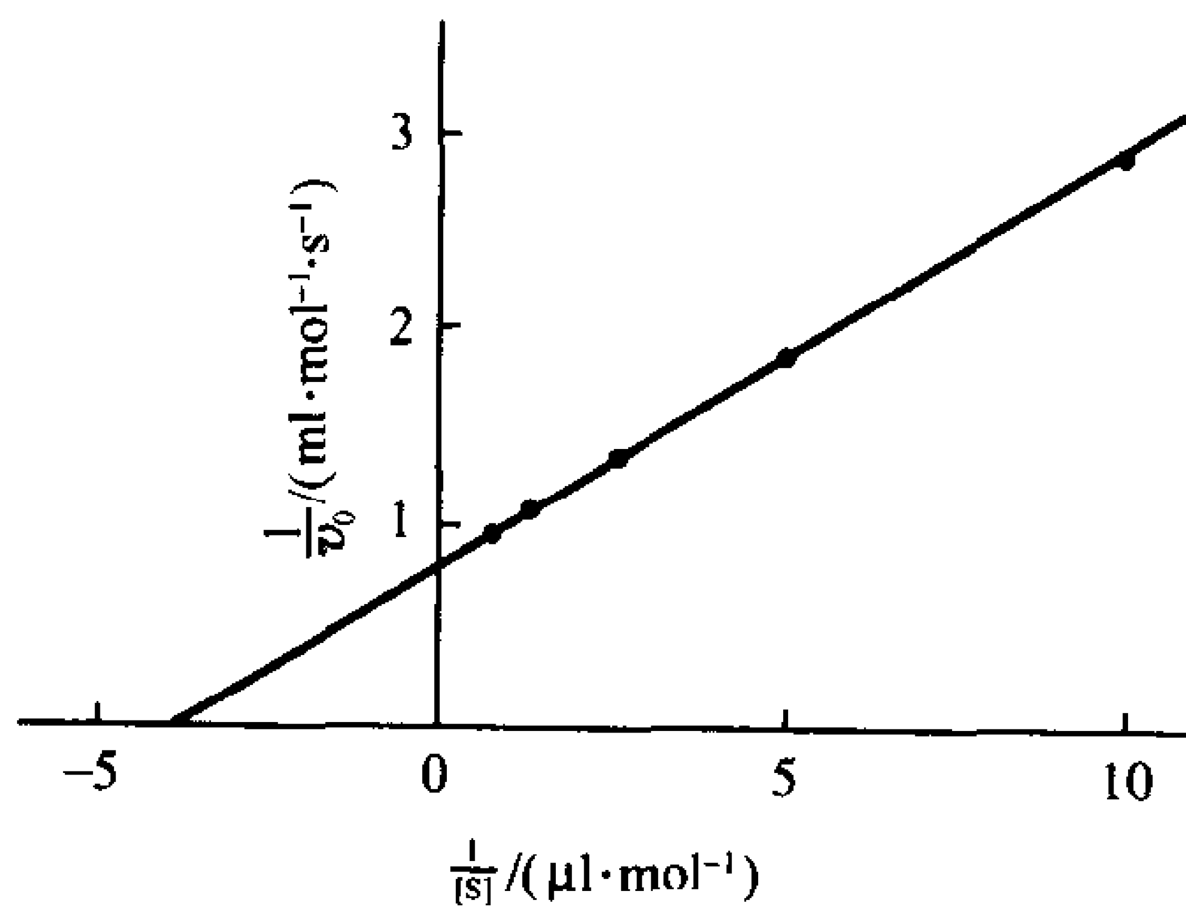
5. A 组对应$[S]>K_M$, B 组对应$[S]<K_M$。理想的情况是在单独一组数据中, 应既包括大于 K_M 也包括小于 K_M 的[S]值。

Set A[S]/($mmol \cdot L^{-1}$)	v_0/($\mu mol \cdot L^{-1} \cdot s^{-1}$)	Set B[S]/($mmol \cdot L^{-1}$)	v_0/($\mu mol \cdot L^{-1} \cdot s^{-1}$)
2	0.42	0.12	0.17
1	0.38	0.10	0.15
0.67	0.34	0.08	0.13
0.50	0.32	0.07	0.11



5 题图

6. 画出 Lineweaver-Burk 图：



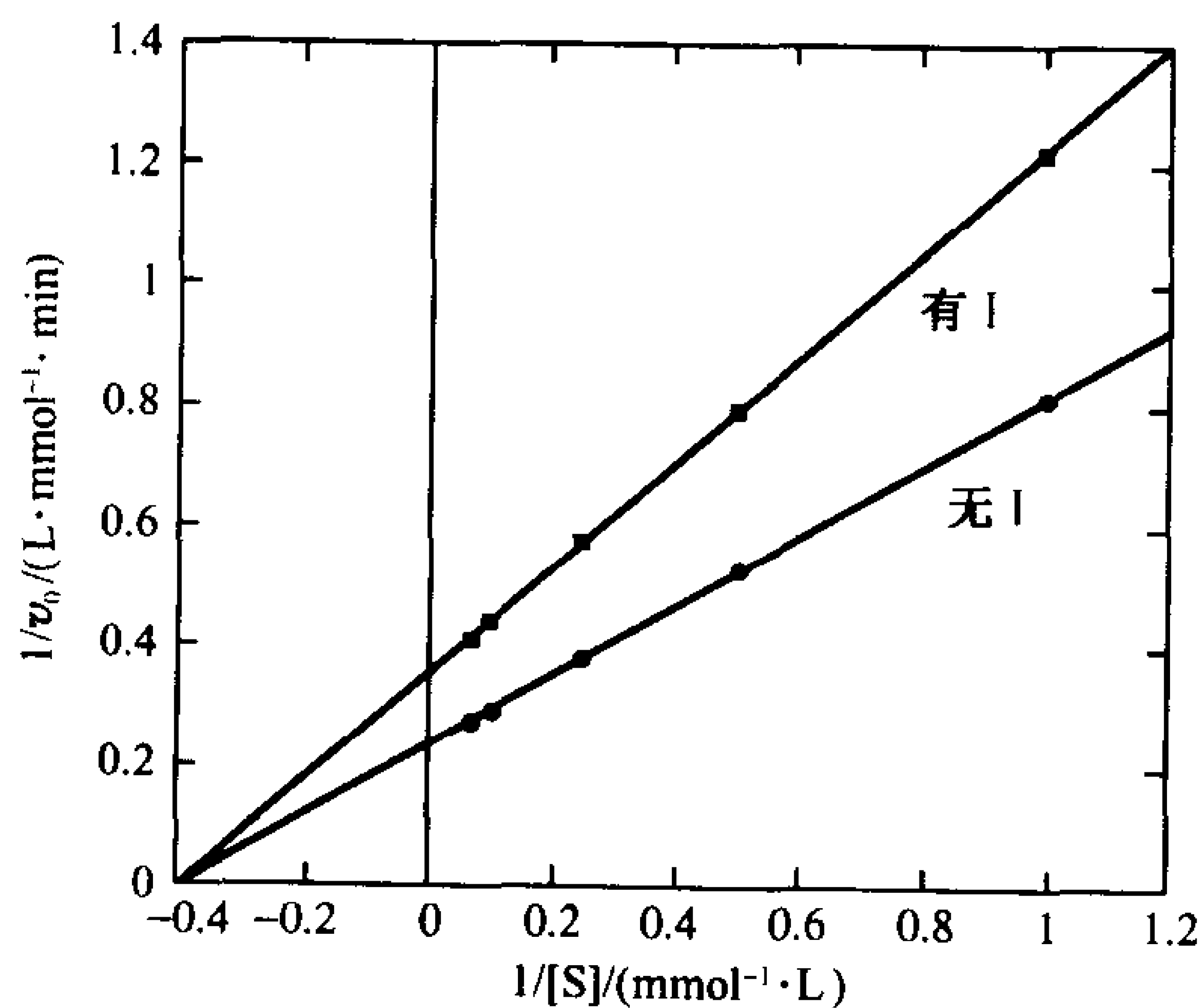
6 题图

$K_M = -1/x$ 轴截矩 $= -1/(-4\mu L \cdot mol^{-1}) = 0.25\mu mol \cdot L^{-1}$

$V_{max} = 1/y$ 轴截矩 $= 1/(0.8 mL \cdot mol^{-1} \cdot s) = 1.25 mmol \cdot L^{-1} \cdot s^{-1}$

7. (a)和(b)仅当反应遵从乒乓机制时，A^* 才会出现，因为只有双置换反应才能在不存在 B 时将同位素从 P 返回换至 A。所以在顺序机制的反应中，A 不会被同位素标记。

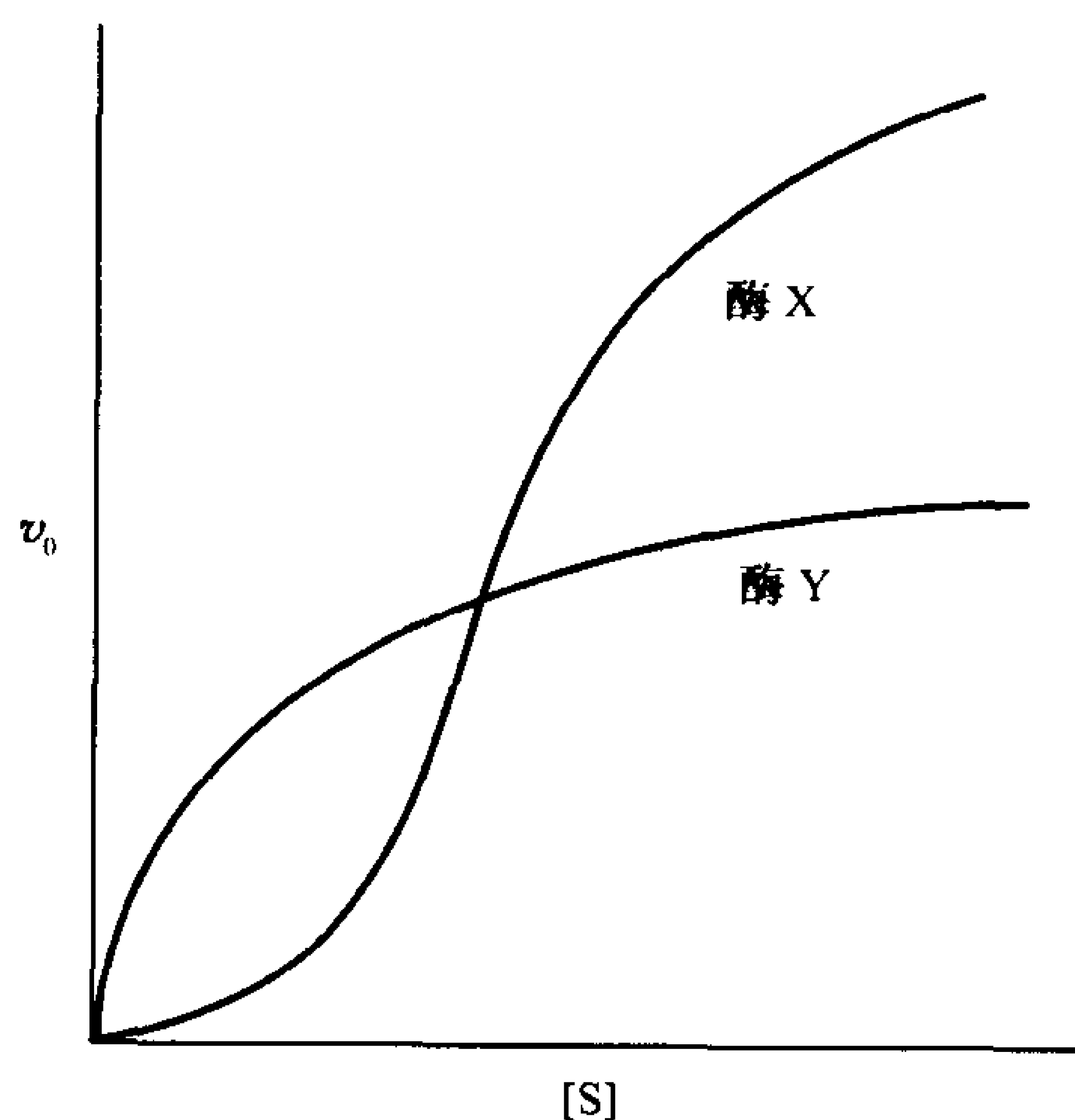
8. 双倒数图的直线交于 $1/v_0$ 轴左侧(在 1/[S]轴上)，所以抑制为混合抑制(并有 $\alpha = \alpha'$)。



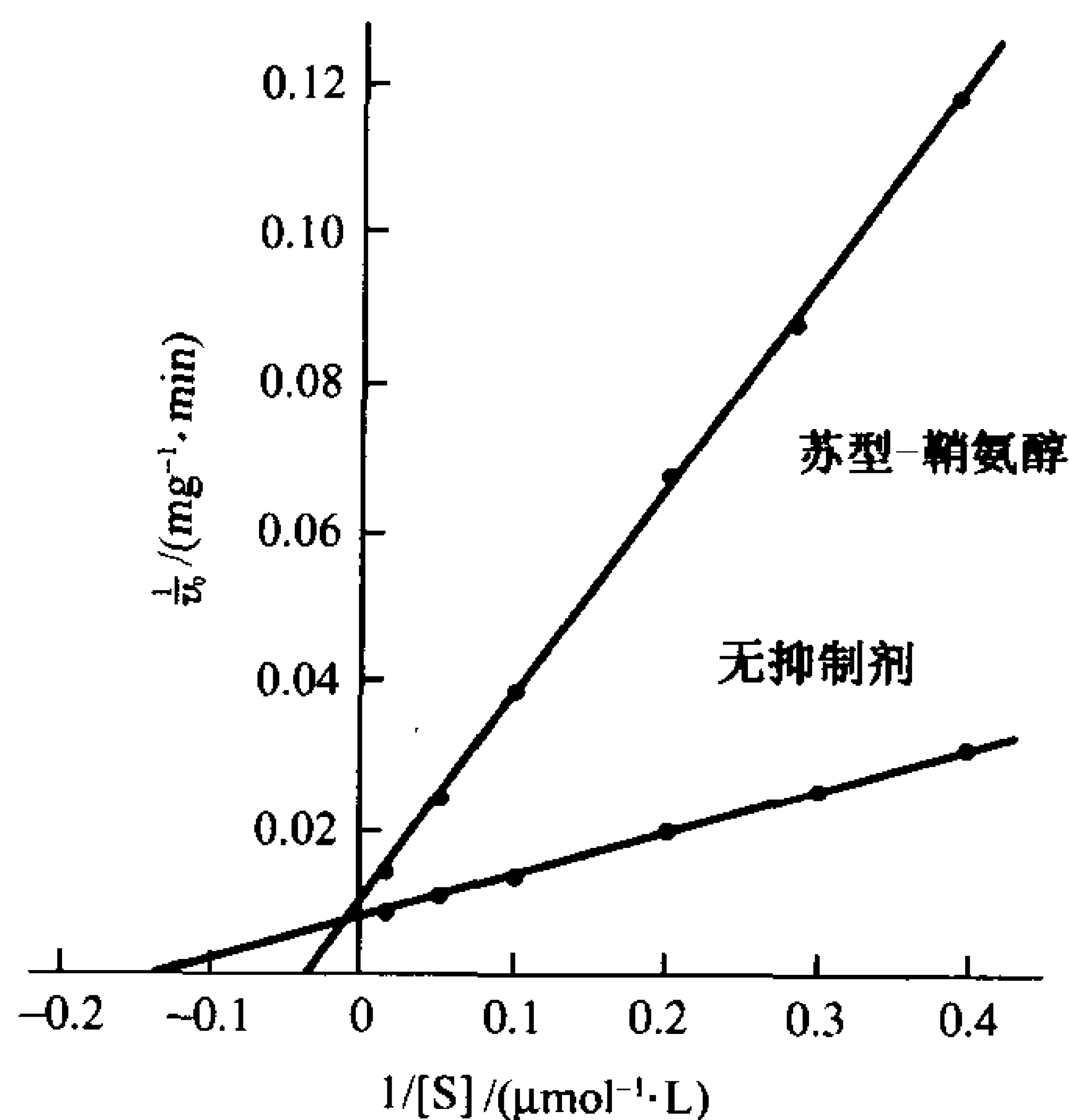
[S]	1/[S]	$1/v_0$	$1/v_0$(有 I)
1	1.00	0.7692	1.2500
2	0.05	0.5000	0.8333
4	0.25	0.3571	0.5882
8	0.125	0.2778	0.4545
12	0.083	0.2500	0.4167

9. 由 Eq.12-33, $\alpha=3$　　$\alpha=3=1+[I]/K_I=1+5\text{mmol}\cdot L^{-1}/K_I$　　$K_I=2.5\text{mmol}\cdot L^{-1}$

10. 酶 Y 在低[S]时更有效率;酶 X 在高[S]时更有效率。



10 题图



11 题图

11. (a) K_M 由 x 轴截矩(= $-1/K_M$)导出,不存在抑制剂时,$K_M=1/0.14\mu\text{mol}\cdot L^{-1}=7\ \mu\text{mol}\cdot L^{-1}$;抑制剂存在时,$K_M=1/0.05\mu\text{mol}\cdot L^{-1}=25\mu\text{mol}\cdot L^{-1}$。$V_{max}$ 由 y 轴截矩(=$1/V_{max}$)导出,抑制剂不存在时,$V_{max}=1/0.008\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}=125\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$;存在抑制剂时,$V_{max}=1/0.01\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}=100\text{mg}\cdot\text{min}^{-1}$。(b)双倒数作图中的直线在非常靠近$1/v_0$轴处相交,所以苏型-鞘氨醇最可能是竞争性抑制剂。竞争性抑制作用也可能是因为抑制剂与底物之间结构上的相似性,这是它们竞争结合酶的活性中心。

第 13 章

1. ATP 的理论最大产量相当于($\Delta G°'$对燃料的氧化)/($\Delta G°'$对 ATP 合成)。
   (a)$(-2850\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})/(30.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})\approx 93\text{ATP}$
   (b)$(-9781\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})/(30.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})\approx 320\text{ATP}$
2. 磷酸基在 pH 6 时比在 pH 5 时更多电离,这就增加了它们的静电相斥,因而增加了 ΔG 水解量(使其更趋于负值)。
3. PPi 被焦磷酸酶放能水解($\Delta G°'=-33.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$)推动了脂肪酸活化。
4. 用方程式 13-1 ATP + 肌酸 ⇌ 磷酸肌酸 + ADP 反应计算 ΔG:

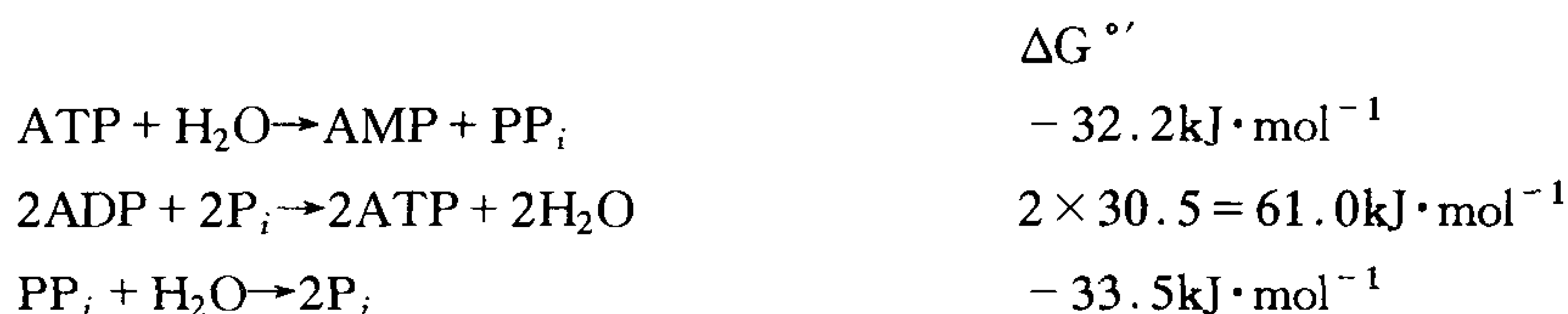
$$\Delta G=\Delta G°'+RT\ln\left(\frac{[\text{磷酸肌酸}][\text{ADP}]}{[\text{肌酸}][\text{ATP}]}\right)$$

$$=12.6\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}+(8.3145\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1})(298\text{K})\ln\left(\frac{(2.5\text{mmol/L})(0.15\text{mmol/L})}{(1\text{mmol/L})(4\text{mmol/L})}\right)$$

$$=12.6\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}-5.9\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}=6.7\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

因为 $\Delta G>0$,反应将沿上述相反的方向进行,也就是朝 ATP 合成方向进行。

5. 用表 13-2 的数据,我们用腺苷酸激酶反应来计算 $\Delta G°'$



	$\Delta G^{\circ\prime}$
$ATP + H_2O \rightarrow AMP + PP_i$	$-32.2 kJ \cdot mol^{-1}$
$2ADP + 2P_i \rightarrow 2ATP + 2H_2O$	$2 \times 30.5 = 61.0 kJ \cdot mol^{-1}$
$PP_i + H_2O \rightarrow 2P_i$	$-33.5 kJ \cdot mol^{-1}$



$2ADP \rightarrow ATP + AMP$　　　　$\Delta G^{\circ\prime} - 4.7 kJ \cdot mol^{-1}$

由于 ΔG 在反应平衡时为零，方程式 13－1 成为 $\Delta G^{\circ\prime} = -RT\ln K_{eq}$，所以 $K_{eq} = e^{-\Delta G^{\circ\prime}/RT}$。

$$K_{eq} = \frac{[ATP][AMP]}{[ADP]^2} = e^{-\Delta G^{\circ\prime}/RT}$$

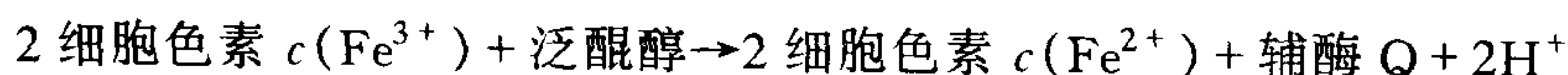
$$[AMP] = \frac{(5 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1})^2}{(5 \times 10^{-3} mol \cdot L^{-1})} \times e^{-(-4700 J \cdot mol^{-1})/(8.3145 J \cdot K^{-1} \cdot mol^{-1})(298K)}$$

$$[AMP] = 3.3 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1} = 0.33 mmol \cdot L^{-1}$$

6. 从表 13-3，还原电位越大，氧化力越强，

化合物	$\xi^{\circ\prime}(V)$
乙酰乙酸	-0.346
NDA^+	-0.315
丙酮酸	-0.185
细胞色素 $b(Fe^{3+})$	0.077
SO_4^{2-}	0.480

7. 平衡方程式为：



2 细胞色素 $c(Fe^{3+})$ + 泛醌醇→2 细胞色素 $c(Fe^{2+})$ + 辅酶 $Q + 2H^+$

用表 13-3 的数据

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(e-受体)} - \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(e-供体)}$$
$$= 0.235V - 0.045V$$
$$= 0.190V$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -n\mathscr{F}\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime}$$
$$= -(2)(96\,485 J \cdot V^{-1} \cdot mol^{-1})(0.190V)$$
$$= -36.7 kJ \cdot mol^{-1}$$

8. 用表 13-3 数据：

(a) $\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(e-受体)} - \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(e-供体)} = \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(延胡索酸)} - \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(NAD^+)} = 0.031V_{-(-0.315V)} = 0.346V$. 由于 $\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} > 0$, $\Delta G^{\circ\prime} < 0$, 反应将自发地如述进行。

(b) $\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(e-受体)} - \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(e-供体)} = \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(细胞色素 b)} - \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(细胞色素 a)} = 0.077V - (0.290V) = -0.213V$。由于 $\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} < 0$, $\Delta G^{\circ\prime} > 0$ 反应将自发地朝如述相反的方向进行。

9. 用表 13-3 的数据。自由 $FADH_2$($\mathscr{E}^{\circ\prime} = -0.219V$)被辅酶 Q($\mathscr{E}^{\circ\prime} = 0.045V$)的氧化。

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(辅酶Q)} - \mathscr{E}^{\circ\prime}_{(FADH_2)}$$
$$= (0.045V) - (-0.219V) = 0.264V$$

$$\Delta G^{\circ\prime} = -n\mathscr{F}\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime}$$

$= -(2)(96\ 485 J \cdot V^{-1} \cdot mol^{-1})(0.264V)$

$= -50.9 kJ \cdot mol^{-1}$

有足够多的自由能催化从 ADP + P_i($\Delta G^{\circ\prime}$ = +30.5kJ·mol^{-1};表 13-2)合成 ATP。



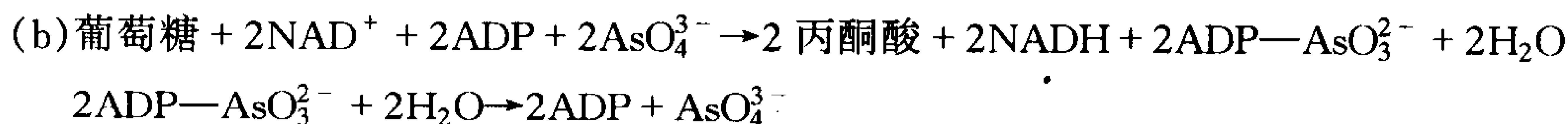
10. $Z \xrightarrow{B} W \xrightarrow{C} Y \xrightarrow{A} X$

第 14 章

1. DHAP 的 C1 和 GAP 的 C1 是非手性的,但在 FBP(C3 和 C4)中变成手性的。一共有 4 种立体异构产物,它们在 C3 和 C4 上有不同的构型,即:果糖-1,6-二磷酸,阿洛糖-1,6-二磷酸,塔格糖-1,6-二磷酸和山梨糖-1,6-二磷酸(见图 8-2)。

2. (a)葡萄糖 + 2NAD^+ + 2ADP + 2P_i → 2 丙酮酸 + 2NADH + 2ATP + 2H_2O

   (b)葡萄糖 + 2NAD^+ + 2ADP + 2AsO_4^{3-} → 2 丙酮酸 + 2NADH + 2ADP—AsO_3^{2-} + 2H_2O

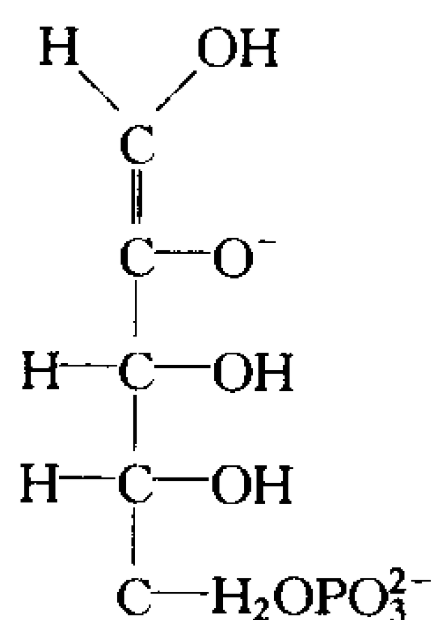


   2ADP—AsO_3^{2-} + 2H_2O → 2ADP + AsO_4^{3-}

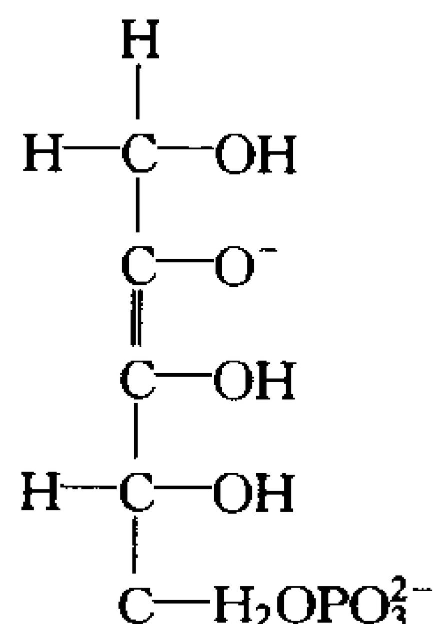
   总反应:葡萄糖 + 2NAD^+ → 2 丙酮酸 + 2NADH

   (c)砷酸盐是一个毒物,因为它在糖酵解中和 ATP 的生成解偶联,结果使糖酵解没有能量产生。

3. 核酮糖-5-磷酸异构酶反应　　　　核酮糖-5-磷酸差向异构酶反应



1,2-烯醇酸中间物



2,3-烯醇酸中间物

4. (a)ΔG 值不同于 $\Delta G^{\circ\prime}$值,因为 $\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + RT \ln$[产物]/[反应物],而细胞的反应物和产物并不在它们的标准状态。

   (b) 是的,在体内条件下也一样。相对 $\Delta G^{\circ\prime}$降低 ΔG,也可以降低 ATP 合成的 ΔG。

5. 当[GAP] = $10^{-4} mol \cdot L^{-1}$,[DHAP] = $5.5 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$

   按照等式 1 - 17, $K = e^{-\Delta G^{\circ\prime}/RT}$

   $$\frac{[GAP][DHAP]}{[FBP]} = e^{-(22\ 800 J \cdot mol^{-1})/(8.3145 J \cdot K \cdot mol^{-1})(310K)}$$

   $$\frac{(10^{-4})(5.5 \times 10^{-4})}{[FBP]} = 1.4 \times 10^{-4}$$

   [FBP] = $3.8 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1}$

   [FBP]/[GAP] = $(3.8 \times 10^{-4} mol \cdot L^{-1})/(10^{-4} mol \cdot L^{-1}) = 3.8$

6. 对于偶联反应



   丙酮酸 + NADH + H^+ → 乳酸 + NAD^+

$$\Delta \mathscr{E}^{\circ\prime} = (-0.185V) - (-0.315V) = 0.130V$$

   按方程式 13-7,

$$\Delta\mathscr{E} = \Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} \frac{RT}{n\mathscr{F}}\ln\left(\frac{[\text{乳酸}][\text{NAD}^-]}{[\text{丙酮酸}][\text{NADH}]}\right)$$

和 $\Delta G = -n\mathscr{F}\Delta$(方程 13-6)。所以 2 个电子在上述反应中被传递，$n=2$。

(a) $\Delta\mathscr{E} = 0.130\text{V} - \frac{RT}{n\mathscr{F}}\ln(1) = 0.130\text{V}$

$\Delta G = -(2)(96\,485\text{J}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1})(0.130\text{V}) = -25.1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

(b) $RT/n\mathscr{F} = (8.3145\text{J}\cdot\text{K}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1})(298\text{K})/(2)(96\,485\text{J}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1}) = 0.01284\text{V}$

$\Delta\mathscr{E} = 0.130\text{V} - 0.01284\text{V}\ln(160\times160)$

$\Delta\mathscr{E} = 0.130\text{V} - 0.130\text{V} = 0$

$\Delta G = 0$

(c) $\Delta\mathscr{E} = 0.130\text{V} - 0.01284\text{V}\ \ln(1000\times1000)$

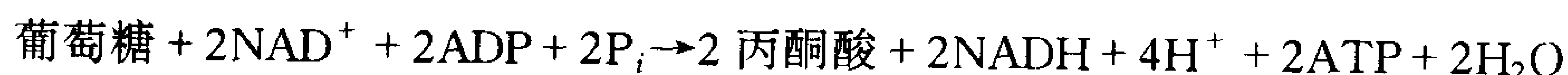
$\Delta\mathscr{E} = 0.130\text{V} - 0.177\text{V} = -0.047\text{V}$

$\Delta G = -(2)(96\,485\text{J}\cdot\text{V}^{-1}\cdot\text{mol}^{-1})(-0.047\text{V}) = 9.1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

7. 丙酮酸激酶在控制代谢物如果糖(在肝脏中)流量的调节中是很重要的，果糖进入糖酵解在 PFK 步骤之后。
8. 3 个葡萄糖分子通过糖酵解产生 6 个 ATP。通过磷酸戊糖途径支路，可产生 5 个 ATP。
9. 标记将出现在 F6P 的 C1 和 C3 上(见图 14-29)。
10. 即使葡萄糖通过糖酵解的通量在柠檬酸循环中断的情况下，葡萄糖仍可通过磷酸戊糖途径氧化而产生 CO_2。
11. 肝脏酶对三种激活剂的敏感性比脑酶高得多。有可能肝脏中的 PFK-1 比脑的 PFK-1 在更大程度上起调节作用。在脑中必须有燃料连续不断地提供，所以糖酵解总是很活跃的。而肝脏则具有广泛的各种生理功能，更可能调节细胞的途径。

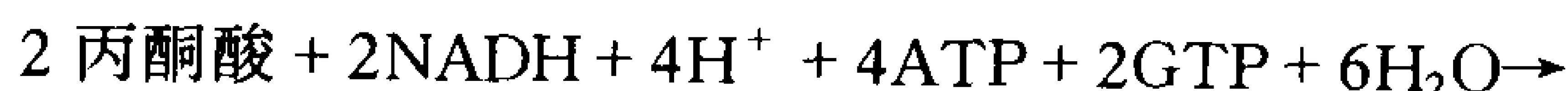
第 15 章

1. (a)糖酵解的方程式是

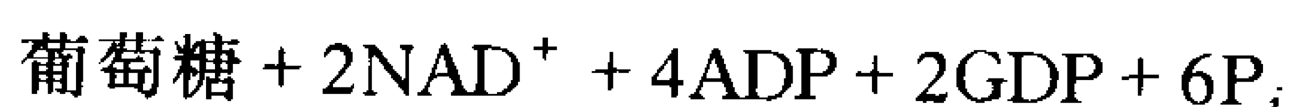


$$\text{葡萄糖} + 2\text{NAD}^+ + 2\text{ADP} + 2\text{P}_i \rightarrow 2\ \text{丙酮酸} + 2\text{NADH} + 4\text{H}^+ + 2\text{ATP} + 2\text{H}_2\text{O}$$

糖异生作用的方程式是

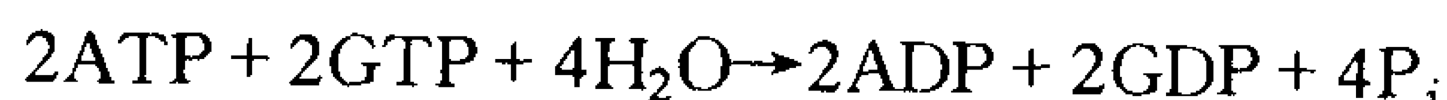


$$2\ \text{丙酮酸} + 2\text{NADH} + 4\text{H}^+ + 4\text{ATP} + 2\text{GTP} + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow$$



$$\text{葡萄糖} + 2\text{NAD}^+ + 4\text{ADP} + 2\text{GDP} + 6\text{P}_i$$

对两个过程的操作顺序



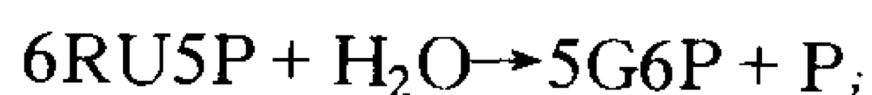
$$2\text{ATP} + 2\text{GTP} + 4\text{H}_2\text{O} \rightarrow 2\text{ADP} + 2\text{GDP} + 4\text{P}_i$$

(b)戊糖磷酸途径 6G6P 的分解代谢方程式是



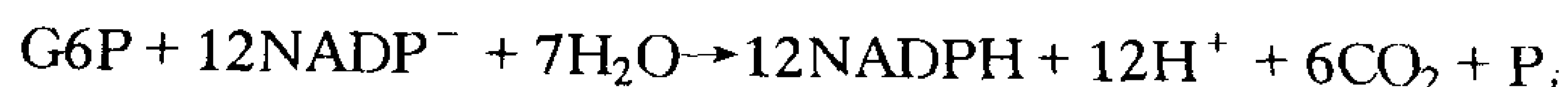
$$6\text{G6P} + 12\text{NADP}^+ + 6\text{H}_2\text{O} \rightarrow 6\text{RU5P} + 12\text{NADPH} + 12\text{H}^+ + 6\text{CO}_2$$

转二羟丙酮基酶，转羟乙醛酶以及糖异生作用能逆转 RU5P 成 G6P：



$$6\text{RU5P} + \text{H}_2\text{O} \rightarrow 5\text{G6P} + \text{P}_i$$

净方程式是



$$\text{G6P} + 12\text{NADP}^- + 7\text{H}_2\text{O} \rightarrow 12\text{NADPH} + 12\text{H}^+ + 6\text{CO}_2 + \text{P}_i$$

2. 磷酸葡萄糖激酶活化生成 G1,6P，需要磷酸葡萄糖变位酶“起动”，使之成为脱磷酸化以及通过失去其 G1,6P 反应中间产物而失活。

3. 去分支总自由能的变化是

分解 α(1→4)键	$\Delta G^{\circ\prime} = -15.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
形成 α(1→6)键	$+15.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
水解 α(1→6)键	$-7.1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
合计	$\Delta G^{\circ\prime} = -7.1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

分支总自由能的变化是

分解 α(1→4)键	$\Delta G^{\circ\prime} = -15.5\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
形成 α(1→6)键	$+7.1\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$
合计	$\Delta G^{\circ\prime} = -8.4\text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$

分支两反应的总和为 $\Delta G<0$，而去分支没有额外水解 α(1→6)键步骤形成葡萄糖，将是吸能反应($\Delta G>0$)。

4. 一种带 28 层的糖原分子将体现储存葡萄糖的最有效排列，其最外层比仅仅 12 层的糖原分子含有更多的葡萄糖残基。然而，大量密集的葡萄糖残基将难以接近磷酸化酶，事实上，如此密集的糖原分子不可能被合成。因为糖原合成酶与分支酶将没有活动空间(见框 15-1 关于糖原结构的讨论)。
5. 在糖原分解代谢过程中，一条弯路通过糖原的合成与糖原的分解以 G6P 开始与终止。这条弯路的能耗为：1 个 ATP。
   消耗在 UDP-葡萄糖焦磷酸酶步骤。因此总能量的丧失为 1/38 或大约 3%。
6. (a)循环[葡萄糖]高因为细胞对胰岛素摄取葡萄糖的信号不响应。
   (b)胰岛素不能活化肌肉中的磷酸蛋白质磷酸酶-1，所以不能刺激糖原的合成。此外，糖原合成因为细胞中可利用的葡萄糖缺乏而大为减少。
7. 肾上腺素结合到其受体刺激 cAMP 的产生。因而通过 cAPK 的催化促进了磷酸化作用。当 cAMP 磷酸二酯酶受抑制，[cAMP]维持在高水平上从而延长了肾上腺的效应。
8. G6P 运输中的不足将出现葡萄糖-6-磷酸酶缺失的症候：糖原积累及低血糖。
9. 肌肉中循环葡萄糖转换到乳酸产生 2ATP。如果肌肉糖原能被调动，能量将是 3ATP，因为糖原的磷酸解绕过己糖激酶催化步骤，在糖酵解的最初阶段消耗 ATP。
10. 缺失是在分支酶内(IV 型糖原贮藏病)。G1P 对葡萄糖的高比例表明不正常的 α(1-4)长链连接少量 α(1-6)分支点(正常的比例为 10 左右)。

第 16 章

1. (a) 因为柠檬酸循环的中间物，如柠檬酸和琥珀酰 CoA，是其他化合物生物合成的前体，厌氧菌必然能合成它们。
   (b) 这些生物并不需要一个完整的柠檬酸循环，因为该循环产生的还原辅酶必须被重新氧化。
2. 柠檬酸必然裂解生成乙酰基和草酰乙酸，然后草酰乙酸能转变为琥珀酸来完成这个循环。
3. (a)标记的碳成为琥珀酰 CoA 中琥珀酰部分的 C4。因为琥珀酸是对称的，标记出现在琥珀酸的 C1 和 C4。当生成的草酰乙酸开始第二轮循环时，标记的碳出现在异柠檬酸

脱氢酶和α-酮戊二酸脱氢酶反应中的$^{14}CO_2$(见图 16-2)。

(b) 标记的碳成为琥珀酰-CoA 的琥珀酰部分的 C3。因此会出现在琥珀酸、延胡索酸、苹果酸和草酰乙酸的 C2 和 C3 上。在第二轮循环中,草酰乙酸的 C2 和 C3 都不以 CO_2 的形式释放。然而,在第二轮循环中,^{14}C 标记出现在琥珀酰-CoA 的琥珀酰部分的 C1 和 C2 上,因此^{14}C 标记出现在生成的草酰乙酸的所有 4 个位置上,从而在第三轮循环中^{14}C 以$^{14}CO_2$ 形式释放。

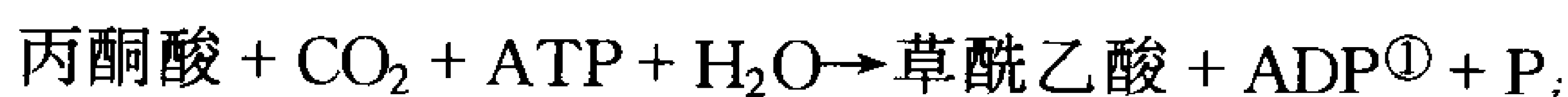
4.



5. NAD^+($\mathscr{E}^{\circ\prime}$ = −0.315V)并没有足够高的还原电势来支持琥珀酸氧化为延胡索酸($\mathscr{E}^{\circ\prime}$ = +0.031V);即琥珀酸脱氢酶反应没有足够的自由能来还原 NAD^+,而酶联 FAD($\mathscr{E}^{\circ\prime}\approx 0$)更适合氧化琥珀酸。

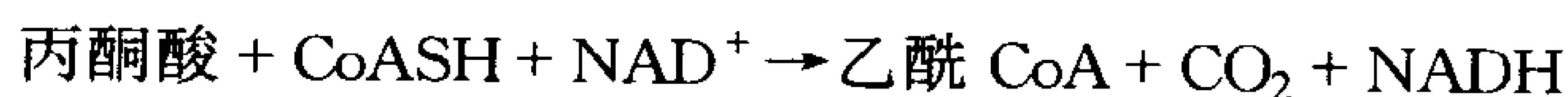
6. 竞争性抑制可以通过加入较多的底物来克服,在本题中即为琥珀酸。草酰乙酸可以克服丙二酸的抑制,是因为它通过柠檬酸循环反应转变为琥珀酸。

7. 为了合成柠檬酸,丙酮酸必须在丙酮酸羧化酶作用下转变为草酰乙酸:



$$丙酮酸 + CO_2 + ATP + H_2O \rightarrow 草酰乙酸 + ADP^{①} + P_i$$

另一个丙酮酸在丙酮酸脱氢酶作用下转变为乙酰 CoA:



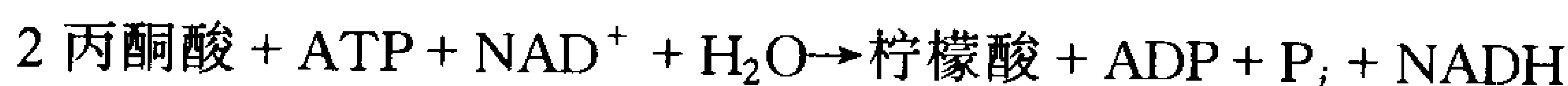
$$丙酮酸 + CoASH + NAD^+ \rightarrow 乙酰\ CoA + CO_2 + NADH$$

然后乙酰 CoA 与草酰乙酸相结合生成柠檬酸:



$$草酰乙酸 + 乙酰\ CoA \rightarrow 柠檬酸 + CoASH$$

净反应是:



$$2\ 丙酮酸 + ATP + NAD^+ + H_2O \rightarrow 柠檬酸 + ADP + P_i + NADH$$

8. 对于异柠檬酸 + $NAD^+ \rightleftharpoons$ α-酮戊二酸 + NADH + CO_2 + H^+ 这个反应,我们假定[H^+]=1 和[CO_2]=1,按公式 13-1:

$$\Delta G = \Delta G^{\circ\prime} + RT\ \ln\left(\frac{[NADH][\alpha\text{-}酮戊二酸]}{[NAD^+][异柠檬酸]}\right)$$

$$= -21 kJ \cdot mol^{-1} + (8.3145 J \cdot K \cdot mol^{-1})(298K)\ln\left[\frac{(1)(0.1)}{(8)(0.02)}\right]$$

$$= -21 kJ \cdot mol^{-1} - 1.17 kJ \cdot mol^{-1}$$

$$= -22.17 kJ \cdot mol^{-1}$$

在生理条件下,反应的自由能如此之大,异柠檬酸脱氢酶可能是代谢的调控点。

9. 观察与代谢区室假设是一致的。代谢途径中酶之间的紧密结合,可以使中间物直接从一个活性中心到另一个活性中心,无需进入大量溶液中,因此一个对称分子的取向和不对称标记形式在一定程度上可被保留。

10. 动物不能从乙酰 CoA(乙酸盐可转变成乙酰 CoA)进行葡萄糖的净合成。然而^{14}C 标记的乙酰 CoA 可进入柠檬酸循环,并转变为草酰乙酸。一些这样的草酰乙酸可以通过糖异生作用转变为葡萄糖,随后被肌肉吸收并参入到糖原中。

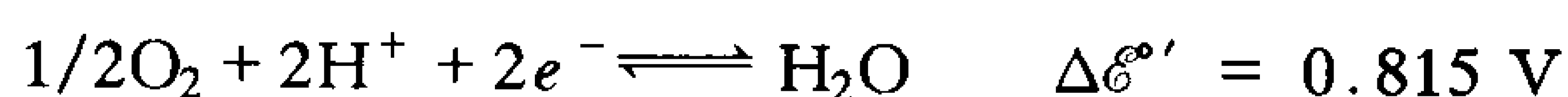
① 原文错为"ATP"。——译者注

第 17 章

1. 线粒体的嵴越多，其表面就越大，也就有更多的蛋白质用于电子传递和氧化磷酸化。那些需要更多合成 ATP 的组织（如心脏）比起那些对氧化磷酸化的需要较低的组织（如肝脏）来说，它们的线粒体带有更多的嵴。
2. 当 NADH 参与磷酸甘油穿梭转运时，NADH 的电子经由复合体 I 传递到 FAD，再传递到 CoQ。因此，每个 NADH 产生 2 ATP。而每个 NADH 参与苹果酸天冬氨酸穿梭时，则产生 3ATP。
3. 表 13-3 中，相应的半反应是：

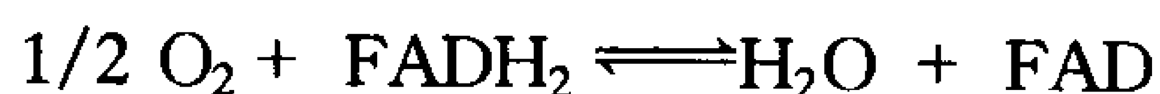


$FAD + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons FADH_2 \qquad \Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = -0.219\ V$



$1/2O_2 + 2H^+ + 2e^- \rightleftharpoons H_2O \qquad \Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = 0.815\ V$

由于 O_2/H_2O 半反应具有更正的半反应，FAD 半反应是逆向的，整个反应就是



$$1/2\ O_2 + FADH_2 \rightleftharpoons H_2O + FAD$$

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = 0.815\ V - (-0.219\ V) = 1.034\ V$$

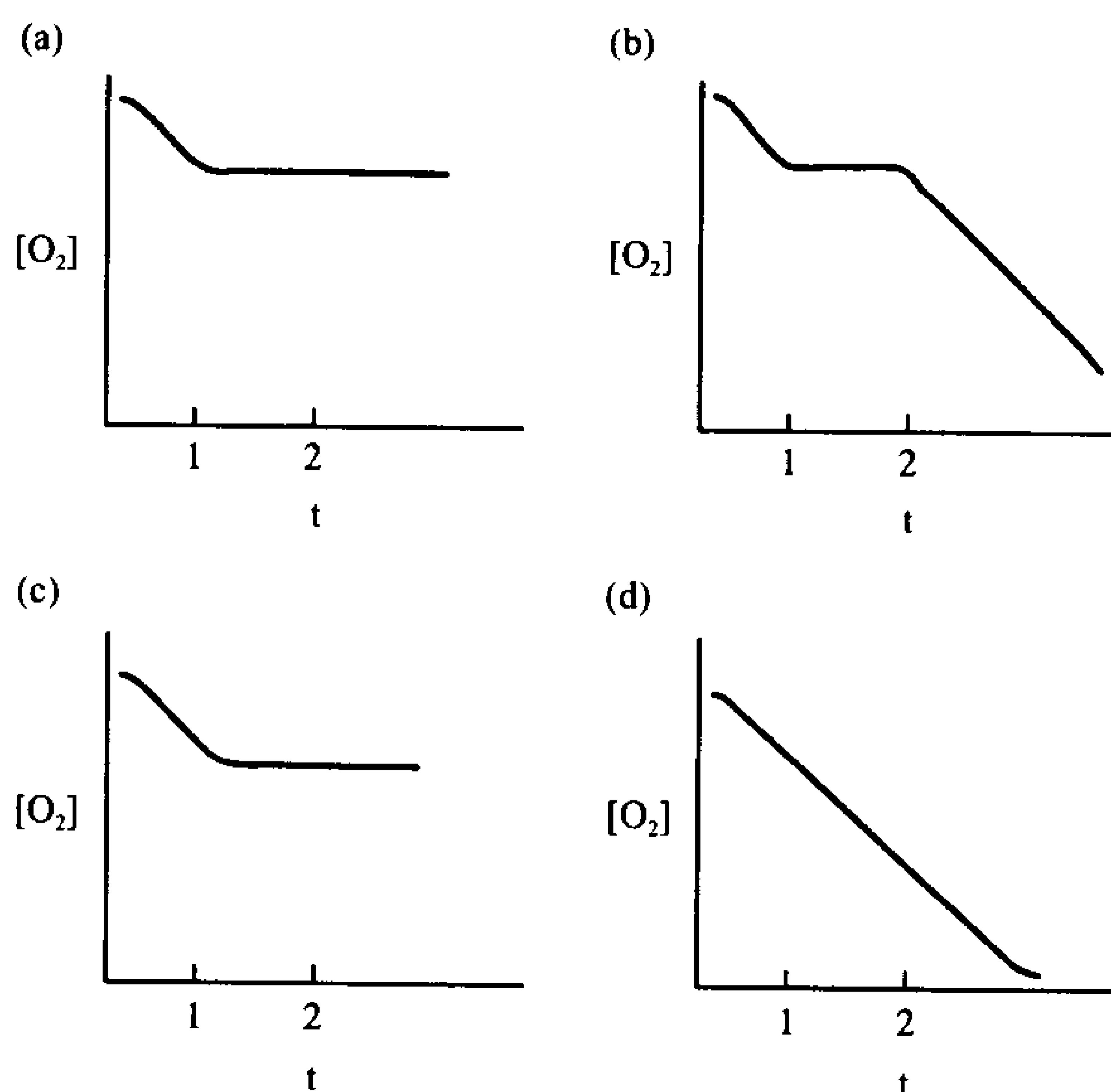
因为 $\Delta G^{\circ\prime} = -n\mathscr{F}\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime}$

$\Delta G^{\circ\prime} = -(2)(96\ 485\ kJ \cdot V^{-1} \cdot mol^{-1})(1.034V) = -200\ kJ \cdot mol^{-1}$

所以，所合成的 ATP 的最大数将是

$200\ kJ \cdot mol^{-1}/30.5\ kJ \cdot mol^{-1} = 6.6$ mol ATP/mol 被 O_2 氧化的 $FADH_2$

4.



(a) 由于安密妥 (amytal) 阻遏复合体 I 中的电子传递，O_2 的消耗停止。

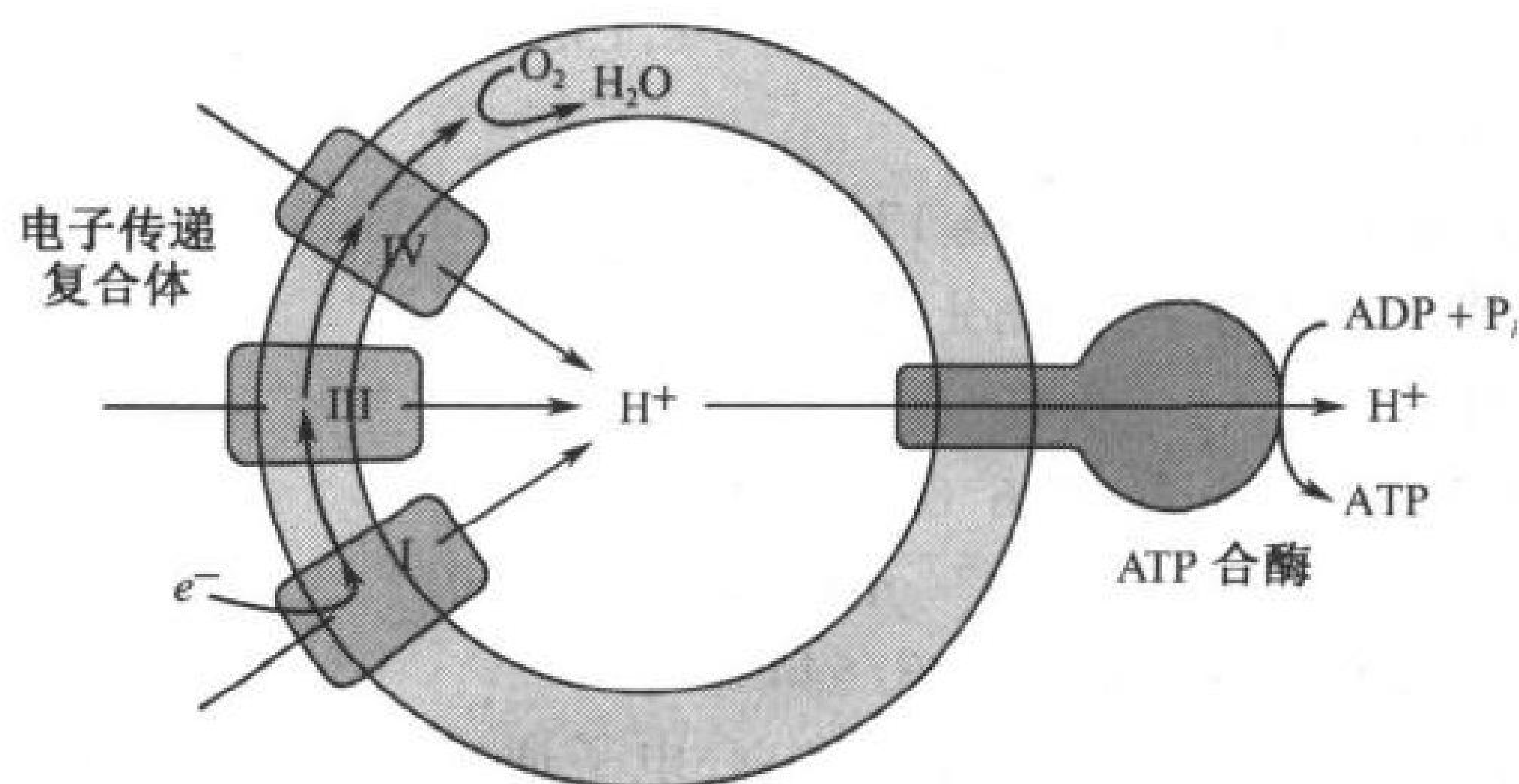
(b) 由琥珀酸来的电子绕过安密妥阻遏进入位于复合体 II 的电子传递链而恢复经由复合体 III 和 IV 的电子传递。

(c) CN^- 阻遏复合体 IV 的电子传递发生在电子由琥珀酸进入传递链之后。

(d) 寡霉素阻止氧化磷酸化，因此阻止氧的消耗；而 DNP 使电子传递与氧化磷酸化去偶联，但是，不阻止氧的消耗。

5. 依赖于氧化还原中心的微环境和反应物与产物的浓度，$\mathscr{E}$可能不同于 $\mathscr{E}^{\circ\prime}$。另外，在复合体内成功的电子转移间的紧密偶联能“拉动”电子而使整个过程自发进行。

6.(a)



(b)外侧 pH 的增高(质子浓度减小)提高跨线粒体膜的电化学势而导致 ATP 合成的增加。

7. DNP 及其相关化合物消除 ATP 合成所必需的质子梯度。这一梯度的消减降低 ATP 合成速率，降低 ATP 质量作用比(即[ATP]/[ADP]——译者注)。这一比值的降低使得对电子传递的抑制减小，从而引起代谢率的提高。

8. 激素刺激储存的甘油三脂水解产生脂肪酸，后者活化 UCP(解偶联蛋白)而且提供燃料，其氧化产生的电子参与产热的电子转移过程。

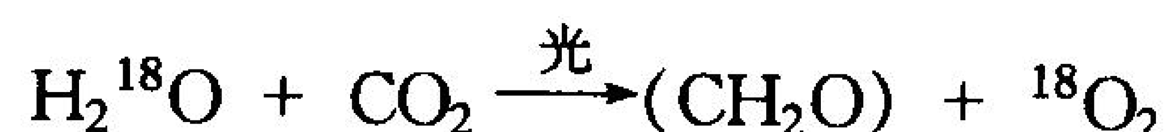
9. 启动有氧代谢，借助氧化磷酸化产生 ATP。ADP 的磷酸化提高[ATP] /[ADP]的比值，由于这一高的 ATP 质量作用比减缓了电子传递，[NADH]/[NAD^+]比值也就升高。[ATP]和[NADH]的升高抑制在糖酵解和三羧酸循环中它们的靶酶而使整个过程减缓。

10. 葡萄糖经戊糖磷酸旁路产生 NADPH，其电子是将 O_2 还原为 $O_2^-\cdot$ 所需要的。

第 18 章

1. 海水的颜色说明这种藻类的光合色素吸收了可见光中除了红色以外的颜色。

2. 标记出现在$^{18}O_2$ 中：



$$H_2{}^{18}O + CO_2 \xrightarrow{\text{光}} (CH_2O) + {}^{18}O_2$$

3. (a)每个光子的能量是 $E = hc/\lambda$，所以每摩尔光子的能量是：

$$E = Nhc/\lambda = (6.022\times10^{23}\ \text{mol}^{-1})(6.626\times10^{-34}\ \text{J}\cdot\text{s})$$
$$\times(2.998\times10^{8}\ \text{m}\cdot\text{s}^{-1})/(7\times10^{-7}\ \text{m})$$
$$=1.71\times10^{5}\ \text{J}\cdot\text{mol}^{-1} = 171\ \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$$

(b)$(171\ \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1})/(30.5\ \text{kJ}\cdot\text{mol}^{-1}) = 5.6$

理论上可以合成 5mol ATP(至少在标准生化条件下)。

4. (a) 有关的半反应是(表 13-3)：

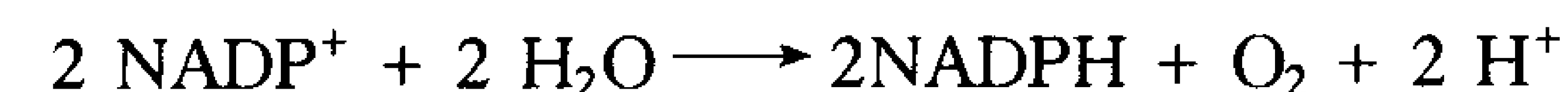


$$O_2 + 4e^- + 4H^+ \longrightarrow 2H_2O \qquad \Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = 0.815V$$



$$NADP^+ + H^+ + 2e^- \longrightarrow NADPH \qquad \Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = -0.320V$$

总反应是



$$2\,NADP^+ + 2\,H_2O \longrightarrow 2NADPH + O_2 + 2\,H^+$$

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = -0.320V - (0.815V) = -1.135V$$

$$\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime} = -n\mathscr{F}\Delta\mathscr{E}^{\circ\prime}$$

$$= -(4)(96\ 485J \cdot V^{-1} \cdot mol^{-1})(-1.135V)$$

$$= 438\ kJ \cdot mol^{-1}$$

(b)1 mol 红光($\lambda = 700nm$)的光子具有的能量是 171kJ。因此,驱动 H_2O 被 $NADP^+$ 氧化,产生 1mol O_2,理论上需要 438/171 = 2.6mol 光子。

(c)1mol UV 光的光子的能量是

$$E = N\,hc/\lambda = (6.022\times10^{23}\ mol^{-1})(6.626\times10^{-34}\ J\cdot s)$$
$$\times(2.998\times10^{8}\ m\cdot s^{-1})/(2.2\times10^{-7}\ m) = 544\ kJ\cdot mol^{-1}$$

产生 1mol O_2需要 220nm 光子的摩尔数是 438/544 = 0.8。

5. 二种系统都介导循环式电子流。光氧化的细菌反应中心电子通过一系列电子载体流动,最后电子回到反应中心($P870^+$)并使之回到起始状态。在 PSI 的循环式电子流动中,电子从光氧化的 P700 转移到细胞色素 b_6f,经质体醌回到 $P700^+$。在这二种情况下,反应中心的氧还态都没有净变化,但是光驱动的电子运动伴随着质子的跨膜运动。
6. 发生循环式电子流时,PSI 的光活化驱动了不依赖于水产生的电子流的电子转移,因此,H_2O 被 PSII 氧化与 PSI 消耗的光子数无关。
7. [O_2]增加使 RuBP 羧化酶-加氧酶的加氧酶活性增加,因而降低了 CO_2 固定的效率。
8. 光源关掉后,ATP 和 NADPH 浓度下降,因为这些物质被用于 Calvin 循环,而且没有光反应进行补充。3PG 在细胞内累积,因为它不能在缺少 ATP 的情况下进行磷酸甘油酸激酶催化的反应。RuBP 浓度下降,因为它被 RuBP 羧化酶催化的反应(既不需要 ATP 也不需要 NADPH)所消耗,由于缺少 ATP 磷酸核酮糖激酶催化的反应被阻断,RuBP 无法得到补充。
9. 卡尔文循环的起始阶段(图 18-20)从 6 分子 CO_2 净合成 2 分子 GAP,消耗了 18 分子 ATP 和 12 分子 NADPH(相当于 36 分子 ATP)。2 分子 GAP 通过糖异生作用生成葡萄糖-6-磷酸(G6P)不需要能量输入(见节 15-4B),G6P 异构为葡萄糖-1-磷酸(G1P)也不需要能量。G1P 被活化为其核苷酸衍生物消耗掉相当于 2 分子的 ATP(见节 15-5),但是葡萄糖残基参入淀粉时释放出 ADP。这些步骤表明总的能量投入是 18 + 36 + 1 = 55ATP。

   淀粉被磷酸解产生 G1P,后者再由糖酵解降解产生 3 分子 ATP、2 分子 NADH(相当于 6 分子 ATP)和 2 分子丙酮酸。2 分子丙酮酸被丙酮酸脱氢酶催化的反应以及柠檬酸循环(见节 16-1)完全氧化为 6 分子 CO_2,产生 8 分子 NADH(相当于 24 分子 ATP)、2 分子 $FADH_2$(相当于 4 分子 ATP)和 2 分子 GTP(相当于 2 分子 ATP)。因此总共产生 3 + 6 + 24 + 4 + 2 = 39 分子 ATP。

   能量消耗与能量产生之比为 55/39 = 1.4。
10. 这些植物通过 CAM 储存 CO_2。在晚上,CO_2 与 PEP 反应生成苹果酸,在清晨,大量的苹果酸积累使叶子带有酸味。在白天,苹果酸转化为丙酮酸 + CO_2,因此叶子酸性减弱,变得无味。傍晚,苹果酸被耗尽,叶子变为弱碱性而带苦味。

第 19 章

1. 缺少肉碱棕榈酰基转移酶 II,活化的脂肪酸就无法正常地转移到线粒体内进行 β 氧化。

因此,像肌肉这样利用脂肪酸作为代谢燃料的组织就不能产生所需要的 ATP。在饥饿时问题更为严重,因为其他燃料如食物葡萄糖不易获得。

2. β 氧化的头三个步骤类似于琥珀酸转化为草酰乙酸的反应(16-3 F-H 部分)。

$$\underset{\text{琥珀酸}}{{}^{-}O_2C-CH_2-CH_2-CO_2^-}\xrightarrow[\text{琥珀酸脱氢酶}]{FAD\ \to\ FADH_2}\underset{\text{延胡索酸}}{{}^{-}O_2C-CH=CH-CO_2^-}\xrightarrow[\text{延胡索酸酶}]{H_2O}$$

$$\underset{\text{L-苹果酸}}{{}^{-}O_2C-CH(OH)-CH_2-CO_2^-}\xrightarrow[\text{苹果酸脱氢酶}]{NAD^+\ \to\ NADH+H^+}\underset{\text{草酰乙酸}}{{}^{-}O_2C-C(=O)-CH_2-CO_2^-}$$

3. (a)需要 6 个循环

(b)三个乙酰-辅酶 A,三个丙酰-辅酶 A,和 1 个甲基丙酰-辅酶 A。

$$CH_3\!\left(-\underset{CH_3}{CH}-CH_2\ \wr\ CH_2-CH_2\ \wr\right)_3\!-\underset{CH_3}{CH}-\overset{O}{\overset{\|}{C}}-SCoA$$

4. 每克不饱和脂肪酸不像饱和脂肪酸富含那麽多的可利用的营养性卡路里。这是因为含双键的脂肪酸的氧化只能生成较少的可氧化驱动 ATP 合成的还原态辅酶。在带有奇数碳位双键的脂肪酸的氧化中,烯酰基-辅酶 A 异构酶反应绕过脂酰-辅酶 A 脱氢酶反应而不生成 $FADH_2$(等价于两个 ATP)。偶数碳位双键必定被 NADPH 还原(相当于失去三个 ATP)。

5. 3-酮脂酰 CoA 转移酶是转化酮体为乙酰 CoA 所需要的。如果肝脏含有这个酶,它将不能够提供酮体作为其他组织的燃料。

6. 棕榈酸(C_{16})合成需要 14 个 NADPH。通过三羧酸转运系统转运 8 个乙酰 CoA 到细胞液,提供了 8 个 NADPH,相当于所需 NADPH 的 57%(8/14×100% = 57%)。

7. 标记不出现在棕榈酸,因为 $^{14}CO_2$ 在脂肪酸合成的第三步反应中被释放出(图 19-22)。

8. 动物不能合成这一种脂肪酸(亚麻酸),因为亚麻酸近于非羧基端 6 碳处含有一个双键。

9. 从源于线粒体的乙酰 CoA 合成硬脂酸(18:0)需要 9 个 ATP 以将 9 个乙酰 CoA 从线粒体输运到细胞液。7 轮的脂肪酸合成消耗 7 个 ATP(在乙酰 CoA 羧化酶反应中)和 14 个 NADPH (等价于 42 个 ATP)。棕榈酸到硬脂酸的延长反应需要 1 个 NADH 和 1 个 NADPH(等价于 6 个 ATP)。因此,能量消耗为 64 个 ATP(9 + 7 + 42 + 6 = 64)。

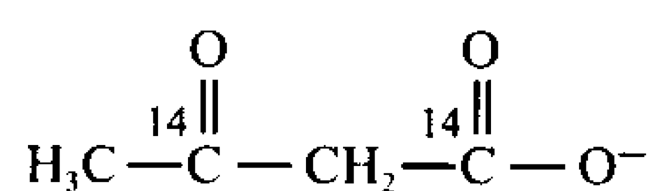
(a)硬脂酸降解为 9 个乙酰 CoA 消耗 2 个 ATP(在脂酰 CoA 合成酶反应中)但是在 8 轮 β 氧化中生成 8 个 $FADH_2$(等价于 16 个 ATP)和 8 个 NADH(等价于 24 个 ATP)。这样,产能为 38 个 ATP(16 + 24 − 2 = 38)。这仅约相当于合成硬脂酸所消耗能量的一半(38 个 ATP 比之于 64 个 ATP)。

(b)9 个乙酰 CoA 通过柠檬酸循环完全氧化成 CO_2 产生另外 9 个 GTP(等价于 9 个

ATP),27 个 NADH(等价于 81 个 ATP)和 9 个 $FADH_2$(等价于 18 个 ATP),共产生 146 个 ATP(38 + 9 + 81 + 18 = 146)。这样,回收的能量是投资于硬脂酸合成所支付能量的两倍多(146 个 ATP 与 64 个 ATP 之比)。

10.

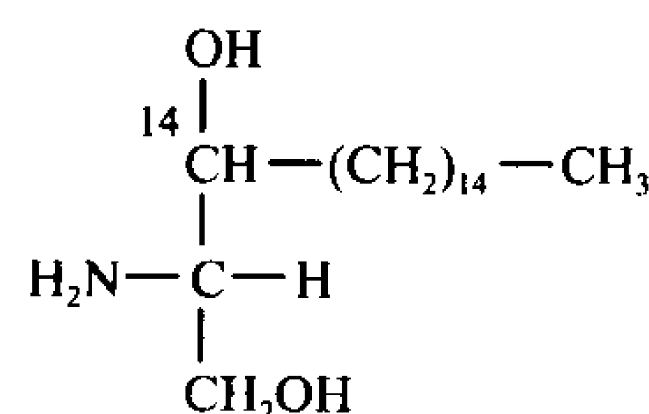
(a)



乙酰乙酸

见图 19-17

(b)

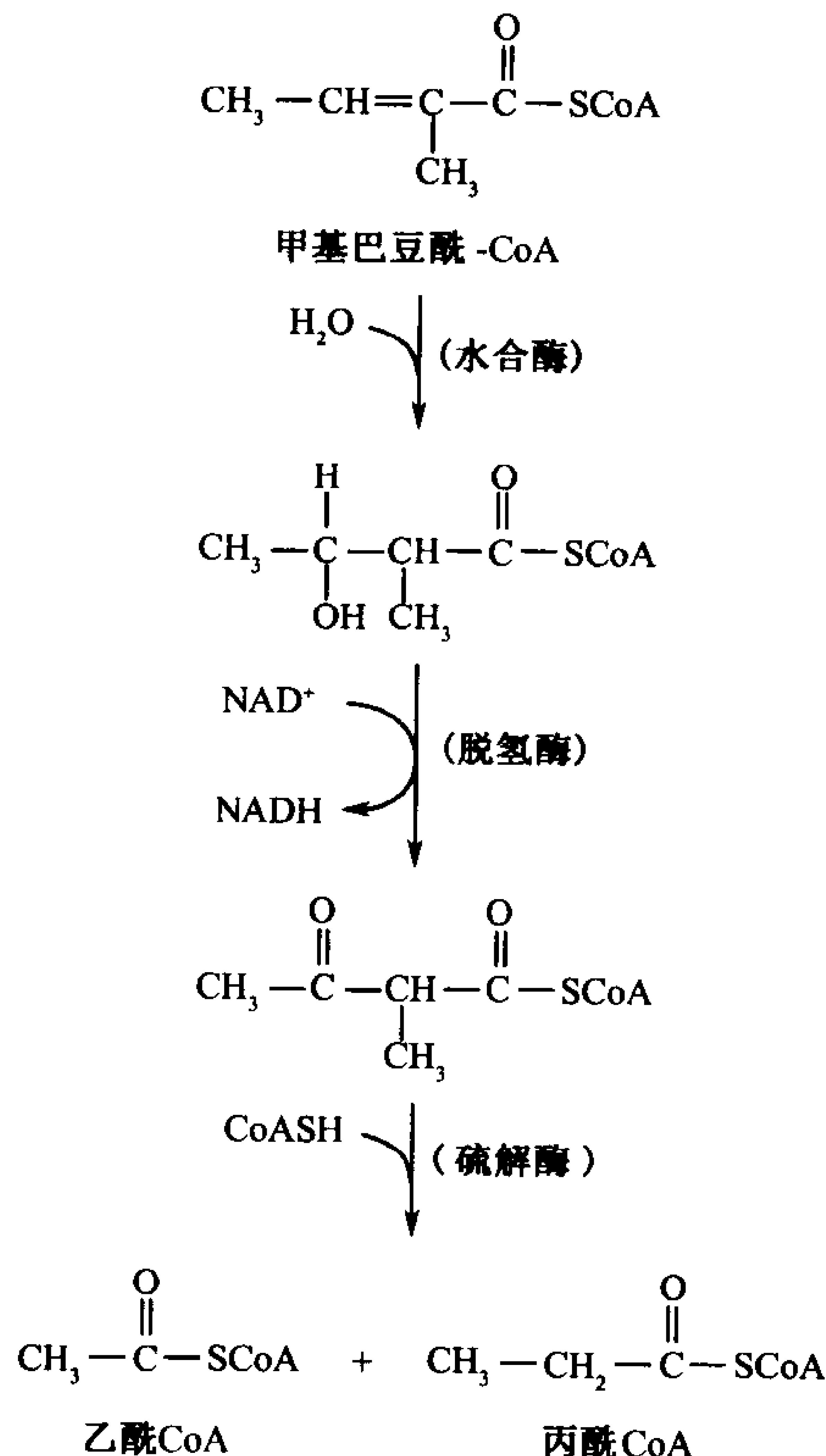


二氢鞘氨醇

见图 19-31

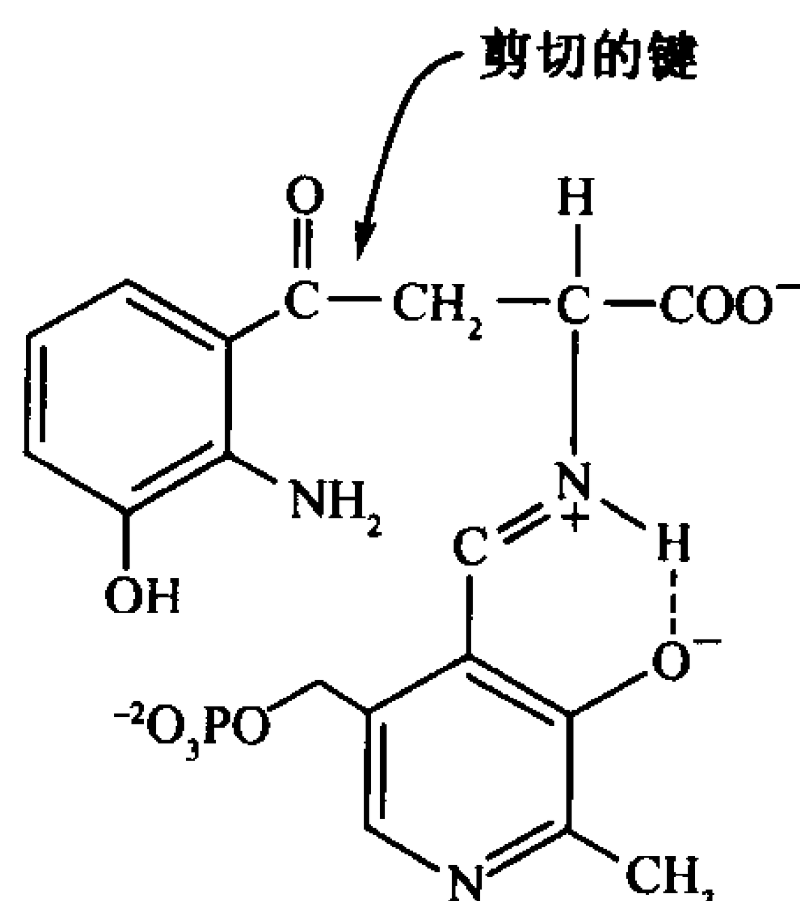
第 20 章

1. 依赖于蛋白酶体的蛋白质酶解,在将泛素连到靶蛋白上去的第一步反应中(图 20-2)需要 ATP 活化泛素。当蛋白质进入蛋白酶体时的去折叠,也需要 ATP。
2. 尿素循环将蛋白质降解产生的过量氮转化为可排泄的形式,尿素。当尿素循环中的酶缺乏时,尿素循环的中间产物可能会累积到中毒水平。低蛋白饮食可减少进入尿素循环的氮含量,从而降低有毒中间产物的浓度。
3. 高浓度氨驱动谷氨酸脱氢酶反应向逆反应方向进行:α-酮戊二酸 + NH_4^+ + NAD(P)H ⟶ 谷氨酸 + $NAD(P)^+$。当柠檬酸循环的中间产物 α-酮戊二酸被耗尽时,柠檬酸循环速度减慢。
4. 由于甲基巴豆酰 CoA 转化为乙酰 CoA 和丙酰 CoA 的三步反应与脂肪酸氧化(β-氧化,图 19-9)的反应类似,因此,反应为:



第 4 题图

5.



6. (a) Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Met, Pro, Ser 和 Val.

(b)Leu 和 Lys

(c)Ile, Phe, Thr, Trp 和 Tyr

7. 色氨酸可以看成是其中的一员,因为它的降解产物之一是丙氨酸,丙氨酸可以通过转氨作用转化为丙酮酸。

8. 在没有尿苷酰去除酶存在的情况下,腺苷酰转移酶 P_{II}将被完全尿苷酰化,因为一旦尿苷酰基连上后,不存在移去机制。尿苷酰化的腺苷酰转移酶 P_{II}使谷氨酰胺合成酶腺苷酰化,从而使之活化。因此,缺陷型的 *E. coli* 细胞会有高活性的谷氨酰胺合成酶,并且使谷氨酰胺浓度高于正常值。需要谷氨酰胺的反应速度就会加快,从而消耗谷氨酸和柠檬酸循环的中间产物 α-酮戊二酸。结果,能量代谢以及需要转氨作用的生物合成反应就会被抑制。

9. 因为只有植物和微生物才能合成芳香族氨基酸,所以抑制这些途径的除草剂不会影响动物中的氨基酸代谢。

10. 使皮肤和头发带有颜色的色素是黑色素,它是从酪氨酸合成的。当酪氨酸供应不足时,例如食物中缺少蛋白质,就不能按正常量合成黑色素,皮肤和头发就会褪色。

第 21 章

1. 血胰岛素过多导致血液中葡萄糖减少。供给脑的葡萄糖浓度减少将引起脑功能丧失(导致昏迷甚至死亡)。

2. ATP 产生途径,例如糖酵解和脂肪酸氧化需要起始的 ATP 投资(糖酵解的己糖激酶和磷酸果糖激酶步骤,进行 β 氧化脂酰 CoA 合成酶激活步骤)。当 ATP 耗尽时该"点火"将不能发生。

3. 被配体占据的受体部分是$\frac{[RL]}{[R]+[RL]}$

因为$[R]+[RL]=0.3\mu mol\cdot L^{-1}$, $[L]+[RL]=2\mu mol\cdot L^{-1}$, $[R]=0.3\mu mol\cdot L^{-1}-[RL]$, $[L]=2\mu mol\cdot L^{-1}-[RL]$

因此,$K=\frac{[R][L]}{[RL]}=1\times10^{-6}mol\cdot L^{-1}$

$$=\frac{(0.3\mu mol\cdot L^{-1}-[RL])(2\mu mol\cdot L^{-1}-[RL])}{[RL]}$$

$[RL]$($\mu mol\cdot L^{-1}$单位)$=0.6-2.3[RL]+[RL]^2$ 或$[RL]^2-3.3[RL]+0.6=0$ 利用二次方程式和取负的平方根,$[RL]=0.19\mu mol\cdot L^{-1}$,(如果取正的平方根,$[RL]=3.11\mu mol\cdot L^{-1}$,该值比总受体浓度大,这是不可能的)

因此,$\frac{[RL]}{[R]_{总}}\times100\%=\frac{0.19\mu mol\cdot L^{-1}}{0.3\mu mol\cdot L^{-1}}\times100\%=63\%$

4. 因为 GTP 类似物不能水解,G_α 保持活性。因此类似物与 G_s 结合增加 cAMP 产量。类似物与 G_i 结合减少 cAMP 产量。

5. 不同,尽管二脂酰甘油第二信使是一样的,但磷脂酰乙醇胺不能产生第二信使 IP_3, IP_3 可引起 Ca^{2+}的释放,转而改变蛋白激酶 C 的活性。

6. 在病毒蛋白存在下,该细胞为了响应生长因子而进行更多细胞分裂循环。

7. 胰岛素通过增加脂肪细胞表面的 GLUT4 受体促进葡萄糖的摄入。葡萄糖源用于供给三

脂酰甘油的甘油-3-磷酸的骨架。

8. 处于休息状态时摄入葡萄糖引起胰腺释放胰岛素。它刺激肝脏、肌肉和脂肪组织用过量的营养素去合成糖原、脂肪和蛋白质,同时抑制这些代谢燃料的降解。因此在跑步之前摄入葡萄糖将加速跑步人的代谢用于休息而不是跑步。

9. 在饥饿期间,由肝脏的草酰乙酸合成葡萄糖削弱了柠檬酸循环中间代谢物的供给,因此降低了肝脏经柠檬酸循环代谢乙酰 CoA 的能力。

10. 正常小鼠产生的瘦身素将进入 *ob/ob* 鼠的循环中,导致食欲减退和体重下降。

第22章

1. (a)7ATP　(b)8ATP　(c)7ATP

2. PRPP 和 FGAR 积累,因为它们是 IMP 生物合成途径中的反应 2 和反应 5 的底物(图 22-1)。XMP 也积累,因为 GMP 合成酶反应被阻断(图 22-3)。虽然谷氨酰胺是氨甲酰磷酸合成酶 II(UMP 合成的第一个酶,图 22-5)的底物,但是该酶的其他底物并不积累。

3. (a)回收的脱氧胞苷酸的碱基和核糖组分被等量标记(也就是说与原来胞苷中标记模式相同)。

   (b)回收的脱氧胞苷酸的碱基和核糖被不等同的标记,因为分离的 ^{14}C-胞嘧啶和 ^{14}C-核糖,在重新结合生成脱氧胞苷酸并再掺入 DNA 前,与不同大小的、未标记的、细胞的胞嘧啶库和核糖库混合。[该实验表明,事实上脱氧核苷酸是从它们相应的核糖核苷酸(选择 a)合成的。]

4. 羟基脲破坏了核糖核苷酸还原酶活性所必需的酪氨酸自由基。肿瘤细胞一般是快速生长的,如果没有为核酸合成提供 dNTP 的核糖核苷酸还原酶,肿瘤细胞就无法存活。与之相反,大多数正常细胞生长缓慢甚至不生长,因此对核酸合成的需求较少。

5. 脱氧腺苷抑制了核糖核苷酸还原酶,从而阻止了 DNA 合成所需的脱氧核苷酸的合成。

6. FdUMP 和氨甲蝶呤杀死快速增殖的细胞,如癌细胞和头发的毛囊细胞,所以头发会脱落。

7. 因为培养基中含有突变细胞无法合成的胸苷,所以这些突变细胞可以生长。而正常细胞不断合成它们自己的胸苷,因此把它们有限的 THF 转变成了 DHF。氨甲蝶呤抑制了二氢叶酸还原酶,所以 THF 不能再生,没有 THF 供给核苷酸和氨基酸的合成,细胞就死亡。

8. 组氨酸和甲硫氨酸的合成需要 THF。细胞中的 THF 在胸苷酸合成酶的作用下转变成 DHF,但在氨甲蝶呤存在时 THF 无法再生。

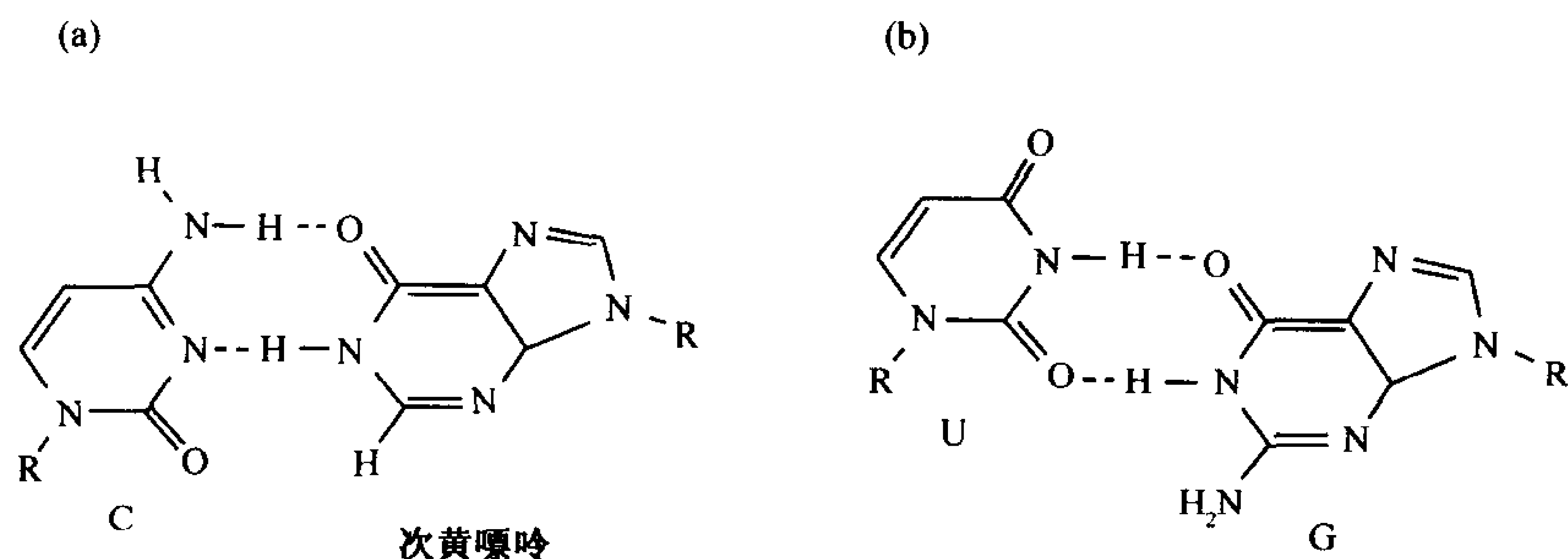
9. (a)三甲氧苄二氨嘧啶结合到细菌的二氢叶酸还原酶上,但并不是永久地使酶失活,因此它并不是酶激活抑制剂。

   (b)别嘌呤醇被黄嘌呤氧化酶氧化成为一种可以不可逆地结合到酶上的产物,因此它是黄嘌呤氧化酶的酶激活抑制剂。

10. 在 von Gierke 疾病(葡萄糖-6-磷酸酶缺乏)中,葡萄糖-6-磷酸在肝细胞中积累,因此促进了磷酸戊糖途径,导致核糖-5-磷酸增多,于是提高了 PRPP 的浓度。反过来,PRPP 促进嘌呤的生物合成,由这些过剩嘌呤降解而来的高水平的尿酸会导致痛风。

第23章

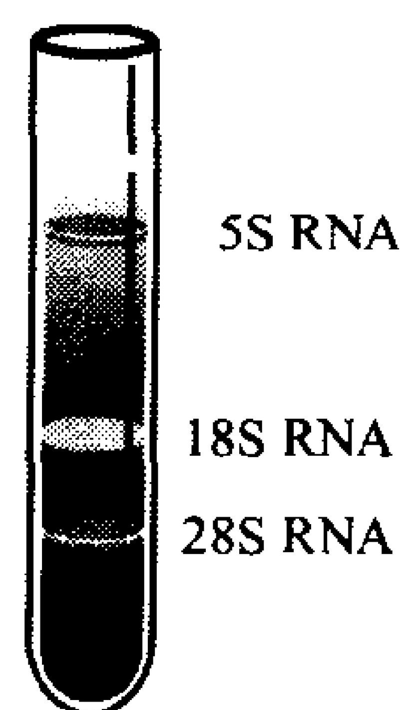
1. 由于氨基酸的平均分子质量约为110Da,50kDa的蛋白质则含有50 000Da÷110Da/残基≈455个残基,这些残基由455×3=1365个核苷酸编码。在B-DNA中,每个碱基对上升3.4Å,所以,1365个碱基对的长度为3.4Å/bp×1365bp=4641Å或0.46μm。如果在A-DNA中,则1365个碱基对的长度为2.6Å/bp×1365bp=3549Å,或0.35μm。
2. (a)次黄嘌呤缺少鸟嘌呤的α′-氨基,它和鸟嘌呤以同样的方式与胞嘧啶配对。



3. (a)超螺旋分子比松弛环更紧密,所以沉积更快。

   (b)正和负超螺旋DNA分子都为超螺旋(图23-10),所以不能用超离心测量来区分它们。
4. 此酶对超螺旋DNA没有任何作用,这是因为切割核糖的C2′—C3′键并不能切断DNA的糖-磷酸链。
5. 在B-DNA转变到Z-DNA的过程中,它是从每圈10.4个碱基的右手螺旋对转变成每圈为12个碱基对的左手螺旋,由于右手双螺旋具有正向缠绕,因此使缠绕减少。$\Delta T = -100/10.4 - 100/12 = -17.9$圈。由于没有共价键的断裂,因此连环数必须保持不变,即$\Delta L = 0$,因此,扭曲数的变化$\Delta W = -\Delta T = -17.9$圈。
6. 20% A残基,即40%为A·T碱基对的片段中含有60%的G·C碱基对,因此,它的熔点比30% A残基的片段来得高,因为30% A残基的片段中只含有40%的G·C碱基对。
7. (a)由于在低离子强度的情况下,磷酸基团的电荷很少相互屏蔽,相互排斥力更强,使双螺旋不稳定,因此其T_m值降低。

   (b)非极性溶剂降低了稳定双螺旋的疏水性,因此降低了T_m值。
8. 最大的RNA形成的带最靠近离心管的底部,最小的RNA形成的带最靠近离心管的上部。



第8题图

9. 靶半区由6个碱基对组成,由于存在四种可能的碱基对,即A·T、T·A、G·C和C·G,任何两个碱基对与对称相关的随机比例为1/4,因此随机发现这6个碱基对的可能性为$(1/4)^6 = 2.4\times10^{-4}$。
10. (a)表观长度为5×10^7bp×3.4Å=1.7×10^8Å=17mm

    (b)核小体中有200bp,压缩的DNA形成80Å高的超螺旋,所以,DNA的长度为(80Å/200bp)×(5×10^7)Å=2mm。

    (c)300Å的细丝每圈含有6个核小体,具有110Å的倾斜,所以DNA的长度是(110Å/6核小体)×(1核小体/200bp)×(5×10^7bp)=4.6×10^6Å=0.46mm。

11. 实验一 限制性内切核酸酶不能来消化基因组 DNA，在电泳时，由于 DNA 太大以至于不能进入凝胶。

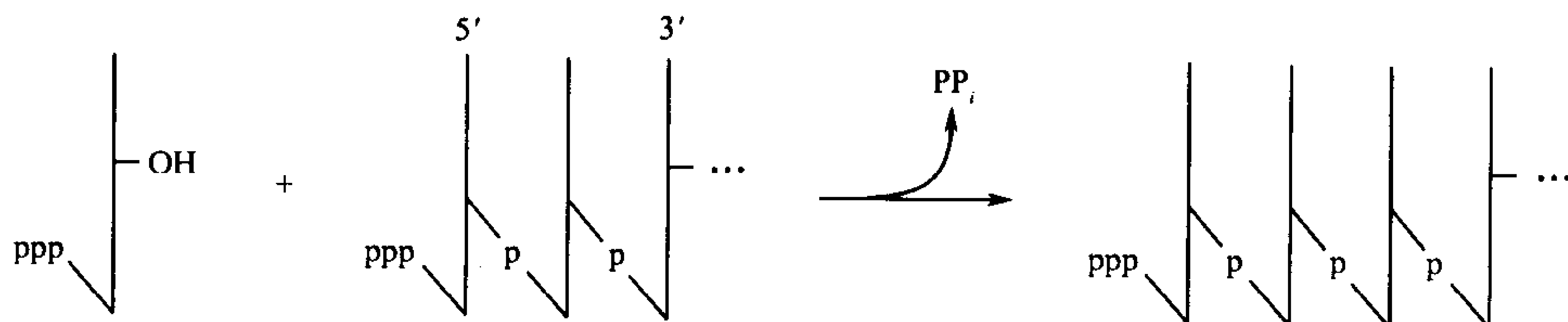
实验二 杂交条件太不严格，以致于导致探针与所有的 DNA 片段发生非特异性杂交。这个问题可以通过煮沸杂交点以去除探针，并在一个较高的温度下重新杂交，或在较低的盐浓度下重新杂交来解决。

实验三 探针与三种不同的老鼠基因杂交，每条带的不同的强度对应序列的相关性。最强的带最类似于人的 *rxr-1* 基因，相反，最不强的带是与 *rxr-1* 基因最不类似。

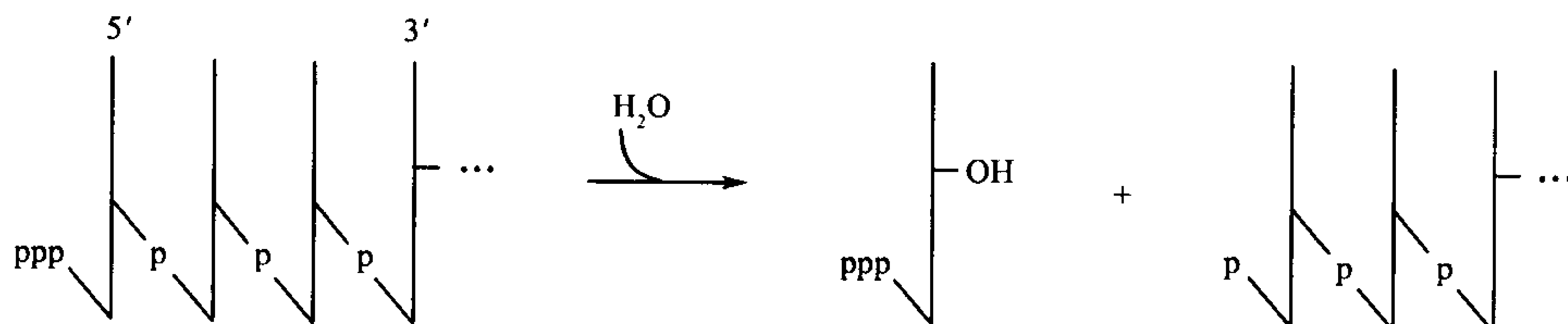
第 24 章

1. 冈崎片段长度为 1000～2000 个核苷酸，而大肠杆菌染色体含有 4.6×10^6 个碱基对。因此，大肠杆菌染色体复制需要 2300～4600 个冈崎片段。
2. 如图 a 所示，核苷酸被加到一个多核苷酸链上，是通过进来的核苷酸的 3′羟基对正在生长的链的 5′三磷酸基的进攻并除去焦磷酸进行的。由 5′→3′外切核酸酶活性(图 b)水解去除一个错配的核苷酸将在 DNA 链的 5′末端只留下一个羟基或单磷酸基。这样就要求在进一步链延长开始之前，多出一个活化步骤。

(a) 3′→5′ 聚合酶

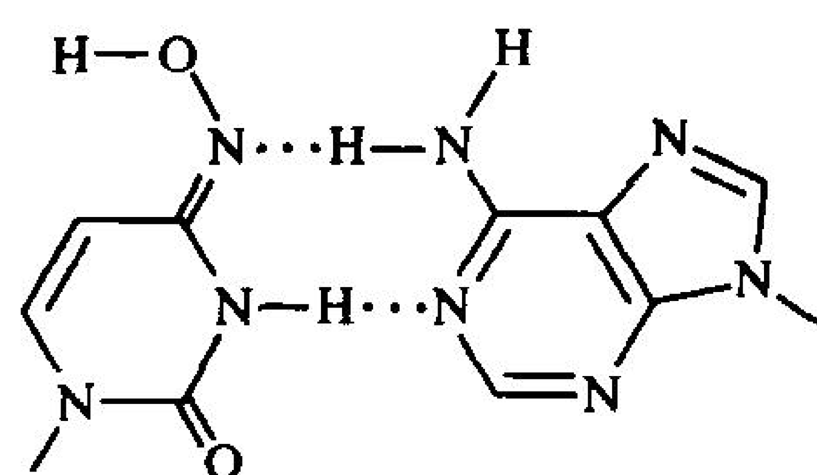


(b) 5′→3′ 外切核酸酶



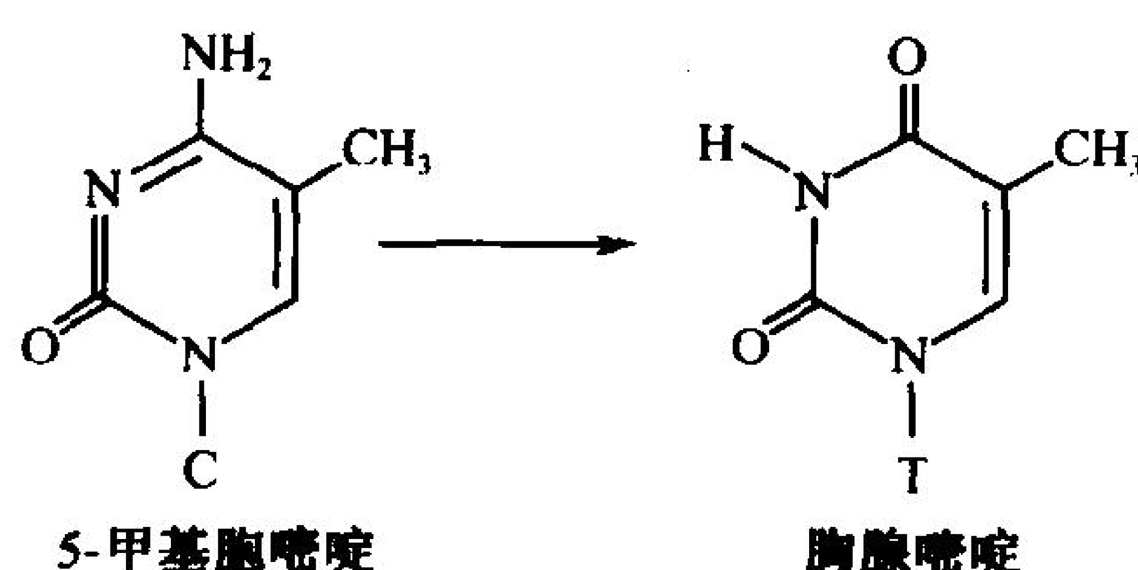
3. 5′→3′外切核酸酶活性对于 DNA 复制是必需的，因为它去除 RNA 引物，并用 DNA 置换它们。这种活性的缺失将是致死性的。
4. 缺少 5′→3′外切核酸酶活性的 Klenow 片段被用来确保所有复制出的 DNA 链具有相同的 5′末端，如果序列是根据片段长度测定的话，这一点就是必需的。
5. DNA 旋转酶增加负超螺旋，用以缓解解旋酶催化的解链在复制叉前面所产生的正超螺旋。
6. 错配修复和其他修复系统可修正被 DNA 聚合酶的校对功能所忽略的错误。
7. 大肠杆菌复制系统只能完整的复制环状 DNA。细菌没有用来复制线状模板链极端 3′末端的机制(例如，端粒酶催化的端粒延伸)。

8. 这个胞嘧啶衍生物与腺嘌呤碱基配对，产生 C·G→T·A 的转换。



腺嘌呤

9. 当 5-甲胞嘧啶残基脱氨基后，它们形成胸腺嘧啶残基。由于胸腺嘧啶是一个正常的 DNA 碱基，修复系统不能确定是这个 T 还是与其相对的 G 是突变的碱基。因此，只有大约一半的脱氨基 5-甲基胞嘧啶被正确修复。



5-甲基胞嘧啶　　　　胸腺嘧啶

10. (a) *dnaB* 编码解旋酶 DnaB。用于解开 DNA 链以进行复制的 DnaB 的丧失将是致死的。

(b) *polA* 编码 Pol Ⅰ。Pol Ⅰ 的丧失将妨碍 RNA 引物的切除，因此是致死的。

(c) *ssb* 编码单链结合蛋白(SSB)，它防止已经分开的单链重新退火。SSB 的缺失将是致死的。

(d) *recA* 编码 RecA 蛋白，它介导一般性重组和 SOS 反应。RecA 的缺失将是有害的，但不一定致死。

11. 大肠杆菌含有低浓度的 dUTP，DNA 聚合酶将它代替 dTTP 掺入 DNA。产生的尿嘧啶碱基迅速地被尿嘧啶-N-糖基化酶切除，接着进行核苷酸切除修复(NER)，这暂时导致在 DNA 上产生一个断裂。在 DNA 聚合酶 Ⅰ 和 DNA 连接酶完成修复过程之前分离到的 DNA 将是一段一段的。然而，在缺乏有功能的尿嘧啶-N-糖基化酶的情况下，不正确的尿嘧啶残基将留在原位，因此前导链 DNA 将是没有断裂的。被不连续复制的后随链仍将含有断裂，尽管比正常情况要少。

第 25 章

1. (a) 蛹虫菌素(cordycepin)是腺苷 3′脱氧类似物。

(b) 因为它没有 3′→OH 基，当它掺入到生长的 RNA 链中时就阻止了链的 5′→3′方向伸长。

2. 上面的链是有意义链

5' CAACGTAACACTTTACAGCGGCGCGTCATTTGATATGATGCGCCCCGCTTCCCGATA 3'

-35 区　　　　-10 区　　　　起始点

它的 TATGAT 片段与启动子的 -10 区域的保守序列 TATAAT 只差一个碱基,它的 TT-TACA 序列与启动子的 -35 区的保守序列 TTGACA 也只差一个碱基,而且恰好位于 -10 区 5′端第 25 位,其起动 G 核苷酸是位于 -10 区下游第 10 位的惟一一个嘌呤。

3. 探针应当含有与 -10 启动子序列 6 核苷酸保守序列相互补的序列:5′ATTATA 3′

4. RNA 聚合酶 II 的启动子成分包括 -27 位序列(即 TATA 框)和 -50 与 -100 之间的序列,插入 10 个碱基对将分割启动子的成分达 DNA 双螺旋一圈的距离(一个螺距),从而减少了起始转录所必需的蛋白质的结合。然而蛋白质结合位点仍然在双螺旋的同一边。如果插入 5 个碱基对(螺旋半圈)将导致蛋白质结合位点移至螺旋的反面,这将使转录的起始更加困难。

5. G·C 碱基对比 A·T 碱基对更加稳定,因此,启动子含的 G·C 碱基对越多,在转录起始时就越难形成开放复合物。

6. 一个 rRNA 基因的转录产生一个 rRNA 分子,它立即掺入核糖体中。与此相反,一个核糖体蛋白基因的转录产生的 mRNA,能进行多次翻译并形成多个相应蛋白质拷贝。因此,rRNA 基因数目比核糖体蛋白基因数目要大得多,以便保证核糖体装配时需要的 rRNA 和蛋白质合成的平衡。

7. 将细胞裂解液加到装有固定化 poly(dT)基质的层析柱上,已加工的 mRNA 的 polyA 尾巴将与 poly(dT) 结合,而其他细胞组分可以被洗去,mRNA 可以通过降底盐浓度的洗脱液洗脱,因为低盐条件下,A·T 碱基对会不稳定。

8. RNase 水解作用要求有一个游离的 2′-OH 基,它能形成 2′,3′-环磷酸中间物(见 11-3A)因而,没有 2′-OH 基的核苷酸残基可以对抗 RNase 催化的水解作用。

9. mRNA 的剪接反应不需要自由能耗,也没有磷酸二脂键的丢失,因而理论上这一过程在体外是可逆的。但在细胞内,由于被切除的内含子的降解使得该反应成为不可逆。

10. snRNA 加工的抑制会干扰 mRNA 的剪接,其结果是宿主 mRNA 不能被翻译。因而宿主的核糖体将只能合成病毒的蛋白质。

第 26 章

1. 4 核苷酸的插入将会引入一个密码子,并使基因的读框移码一个核苷酸。正常的读框可能通过删除一个核苷酸而恢复。然而,如果①4 核苷酸的插入破坏了一个功能上很重要的氨基酸;②4 核苷酸的插入产生了一个破坏结构的氨基酸的密码子;③4 核苷酸的插入在基因中引入了一个提早的终止密码子;或④单核苷酸的删除位点距 4 核苷酸的插入位点太远,以至于尽管阅读框得以恢复,但在插入位点和删除位点之间隔了一段很长的移框的密码子,那么基因的功能也不会得到恢复。

2. 可能的密码子有:UUU, UUG, UGU, GUU, UGG, GUG, GGU 和 GGG。编码的氨基酸为 Phe, Leu, Cys, Val, Trp 和 Gly(见表 26-1)。

3. 琥珀型突变 UAG 可以由 XAG, UXG 或 UAX 密码子的任何一种通过点突变产生。XAG 密码子编码 Gln, Lys 和 Glu; UXG 密码子编码 Leu, Ser 和 Trp; UAX 的两种非终止密码子都编码 Tyr。因此,某些编码这些氨基酸的密码子可以通过点突变成为 UAG。

4. 核糖体不能翻译双链 RNA,因此,反义 RNA 和 mRNA 的碱基配对可以阻止 mRNA 的翻译。

5. Phe 缺乏 Tyr 中的—OH，因而和 TyrRS 的结合太弱，以至于在很大程度上难以参与氨酰化反应。

6. 只有新合成的细菌多肽的 N 末端才有 fMet。因而，在哺乳动物系统中出现 fMet，就表明有细菌的侵入。因此，识别 fMet 残基的白细胞就可以通过吞噬作用来对抗这些细菌。

7. 核糖体含有 52 种蛋白质和 3 种 RNA。最低限度还需要 31 种非起始 tRNA，及 20 种与之相应的氨酰-tRNA 合成酶。还需要 $tRNA_f^{Met}$（其氨基酸的接载由 Met 氨酰-tRNA 合成酶催化）。翻译起始需要 3 种因子：IF-1、IF-2 和 IF-3。延伸需要 3 种因子：EF-Tu、EF-Ts 和 EF-G。翻译终止需要 3 种因子：RF-1、RF-2 和 RF-3。还需要 mRNA。因此，不同大分子的总数是：$52+3+31+20+1+3+3+3+1=117$。

8. 原核生物的核糖体可以选择位于 mRNA 分子上任何位置的起始密码子，只要该密码子位于 S-D 序列的下游。相反，真核生物的核糖体通常选择最靠近 mRNA 5′末端的 AUG。因此，真核生物的核糖体不能识别环形 mRNA 分子上的翻译起始位点。

9. 假设 fMet 前导残基和通常的情况一样，在成熟的多肽中是被去除掉的：
翻译起始需要 1 分子 GTP（1 个 ATP 当量）。
100 个循环的延伸作用需要 100 个 GTP（100 个 ATP）给 EF-Tu 反应，100 个 GTP（100 个 ATP）给 EF-G 反应。
翻译终止需要 1 个 GTP（1 个 ATP）。
每分子氨酰-tRNA 的合成需要分解 ATP 的焦磷酸，因此需要 2 当量的 ATP。总共需要 101 分子的氨酰-tRNA：前导 $Met\text{-}tRNA_f^{Met}$ + 100 分子其他的氨酰-tRNA。
这样，ATP 的当量数 $=1+100\times2+1+101\times2=404$（如果前导 fMet 保留在成熟的多肽中，这个数值将为 400，因为合成 100 个氨基酸残基的多肽将少一个氨酰-tRNA 和少一步延伸步骤）。

10.

	起始	Lys	Pro	Ala	Gly	Thr	Glu	Asn	Ser	终止
5′-AGGAGCUX$_{\sim4}$	$^{A}_{G}$UG	AA$^{A}_{G}$	CCX	GCX	GGX	ACX	GA$^{A}_{G}$	AA$^{U}_{C}$	UCX	UAA 或 UAG-3′
S-D 序列。允许有 3～10 个 G·U 碱基对								AG$^{U}_{C}$		UGA

11. (a) 每个 ORF 从一个起始密码（ATG）开头，以一个终止密码（TGA）结尾：
ATGCTCAACTATATGTGA 编码 *vir*-2，而在互补链上的
ATGCCGCATGCTCTGTTAATCACATATAGTTGA 编码 *vir*-1。
(b) *vir*-1：MPHALLITYS；*vir*-2：MLNYM。
(c) *vir*-1：MPHALLIPYS；*vir*-2：MLNYMGLTEHAA。

12. 有 4 个外显子（下划线的碱基）
TATAATACGCGCAATACAATCTACAGCTTCGCGTAAATCGTAGGTAAGTTG-
TAATAAATATAAGTGAGTATGATAGGGCTTTGGACCGATAGATGCGACCCT
GGAGGTAAGTATAGATAATTAAGCACAGGCATGCAGGGATATCCTCCAAAT
AGGTAAGTAACCTTACGGTCAATTAATTAGGCAGTAGATGAATAAACGAT
ATCGATCGGTTAGGTAAGTCTGAT
因此，具有 5′帽子及 3′ploy(A) 尾的成熟 mRNA 有以下序列：

GCGUAAAUCGUAGGCUUUGGACCGAUAG**AUG**CGACCCUGGAGCAUGCAGGGA
UAUCCUCCAAAUAGCAGUAGA**UGA**AUAAACGAUAUCGAUCGGUUAGGU
其中的起始密码子和终止密码子以黑体显示。
编码的蛋白质序列如下：
MRPWSMQGYPPNSSR

第 27 章

1. 事实上，*E. coli* 的所有基因序列都是单拷贝的。所以 *E. coli*DNA 的复性过程是一个每一片段与互补链重新结合的简单过程。而在人类基因组中，有很多的重复 DNA 序列，很多含有这些重复序列的片段在形成双链（复性）过程中比同样存在于人类基因组中的单拷贝的 DNA 序列要快的多，所以就出现了二级的复性曲线。
2. 因为相关功能蛋白质的编码基因位于操纵子中。操纵子中一个或几个基因的识别同时可以表明其中其余部分基因的功能。
3. a. O_1 是主要的抑制子结合部位，所以当它缺失时，*lac* 抑制子不能稳定的结合在操纵子上，从而不能进行抑制作用。
   b. O_2 和 O_3 序列是抑制子的次级结合序列。如果有一个缺失，另一个依然可以工作，只会造成抑制作用的小幅度减弱。
   c. 如果 O_2 和 O_3 都缺失，抑制子只能结合上 O_1 序列，这可以部分的干扰转录过程，但是不可能像 *lac* 抑制子协同结合上 O_1 序列和其他操纵子序列后形成 DNA loop 那样完全的抑制转录。
4. 在没有 β-乳糖酶（是 *lacZ* 基因的产物）的情况下，半乳糖不能转变成诱导因子异乳糖。从而，Lac 酶，包括半乳糖苷酶，就不会被合成。
5. 既然除了 *lac* 操纵子以外的其他操纵子能保持它们对缺少葡萄糖的敏感性，那么这种缺失不可能是发生在编码 CAP 的基因上。而可能发生在 *lac* 操纵子的结合 CAP-cMAP 的部分序列上。
6. 真核生物的转录过程发生在细胞核内而翻译过程发生在细胞质内。因此，真核细胞中，核糖体不与新生成的 mRNA 结合在一起，而这是原核生物中衰减作用的基本条件。
7. 将 *trpL* 的前导多肽序列删除会导致衰减因子的序列 1 的消失。因而会形成 2·3 发卡结构而不是 3·4 发卡结构。转录过程就会延续到 *trp* 操纵子的后续部分，这就会被 *trp* 抑制因子单独调控。
8. a. *gpN* 是一个反终止子；没有了它，噬菌体不能转录复制所用蛋白的编码基因。从而只能进行裂解过程。
   b. cII 是裂解过程说必需的。没有了它，噬菌体只能进行溶原过程。
   c. *cro* 编码抑制所有 λ 噬菌体基因包括 λ 抑制因子的转录。所以缺少了它，λ 抑制因子将持续声称，只允许进行裂解过程。
9. 在基因启动子下游的一段序列（例如：在编码区内）可以调控基因的表达，如果这段序列被合适的转录因子识别，从而使生成的 DNA-蛋白复合物可以持续的补充 RNA 聚合酶到启动子上。
10. RNA 在体内的降解敏感性使得可以通过调节 mRNA 的降解速度来进行基因表达的调

控。如果 mRNA 非常稳定,那么即使在细胞不再需要编码蛋白的时候,依然会不断的进行翻译。

11. 显然,*esc* 基因是一种母体基因。这样,*esc* 基因合适的分配在受精卵中,显然是由母体决定的,足够进行正常的胚胎发育而不用考虑胚胎的基因型。

常用缩略语

A	腺嘌呤
aaRS	氨基酸-tRNA合成酶
ACAT	脂酰-辅酶A胆固醇脂酰基转移酶
ACP	脂酰载体蛋白
ADA	腺苷脱氨酶
ADP	腺苷二磷酸
AIDS	获得性免疫缺损症
ALA	δ-氨基酮式酸
AMP	腺苷一磷酸
ATCase	天冬氨酸转氨甲酰酶
ATP	腺苷三磷酸
BChl	菌绿素
bp	碱基对
BPG	D-2,3-二磷酸甘油酸
BPheo	菌褐藻素
BPTI	牛胰蛋白酶抑制剂
C	胞嘧啶
CaM	钙调蛋白
CAM	景天酸代谢
cAMP	环AMP
CAP	降解代谢物基因激活蛋白
cAPK	CAMP依赖蛋白激酶
CDK	细胞周期蛋白依赖性激酶
cDNA	互补DNA
CDP	胞苷二磷酸
CE	毛细管电泳
Chl	叶绿素
CM	羧甲基
CMP	胞苷一磷酸
CoA(CoASH)	辅酶A
CoQ	辅酶Q(泛醌)
CPS	氨甲酰磷酸合成酶
CTP	胞苷三磷酸
D	道尔顿
d	脱氧
DCCD	二环己基碳二亚胺
dd	双脱氧
ddNTP	2′,3′-二脱氧核苷三磷酸
DEAE	二乙基氨基乙基
DG	1,2-二脂酰甘油
DHAP	磷酸二羟丙酮
DHF	二氢叶酸
DHFR	二氢叶酸还原酶
DNA	脱氧核糖核酸
DNP	2,4-二硝基苯酚
dNTP	2′-脱核苷三磷酸
E4P	赤藓糖-4-磷酸
EF	伸长因子
ELISA	酶联免疫吸附法
emf	电动力
ER	内质网
ETF	电子传递黄素蛋白
FIP	果糖-1-磷酸
F2,6P	果糖-2,6-二磷酸
F6P	果糖-6-磷酸
FAD	黄素腺嘌呤二核苷酸,氧化型
$FADH_1$	黄素腺嘌呤二核苷酸,自由型
$FADH_2$	黄素腺嘌呤二核苷酸,还原型
FBP	果糖-1,6-二磷酸
FBPase	果糖-1,6-二磷酸酶
Fd	铁氧还蛋白
FH	家族性高胆固醇血症
fMet	*N*-甲基甲硫氨酸
FMN	黄素单核苷酸
G	鸟嘌呤
G1P	葡萄糖-1-磷酸
G6P	葡萄糖-6-磷酸
G6PD	葡萄糖-6-磷酸脱氢酶
GABA	γ-氨基丁酸
Gal	半乳糖
GalNAc	*N*-乙酰半乳糖胺
GAP	3-磷酸甘油醛
GAPDH	3-磷酸甘油醛脱氢酶
GDP	鸟苷二磷酸
Glc	葡萄糖
GlcNAc	*N*-乙酰葡萄糖胺
GMP	鸟苷一磷酸
GPI	糖基磷脂酰肌醇
GSH	谷胱甘肽
GSSH	还原型谷胱甘肽
GTF	通用转录因子
GTP	鸟苷三磷酸
Hb	血红蛋白
HDL	高密度脂蛋白

HIV	人免疫缺陷病者
HMG-CoA	β-羟-β-甲基式二酰 CoA
hnRNA	核异质 RNA
HPLC	高效液相层析
Hsp	热休克蛋白
HTH	螺旋-转角-螺旋
Hyl	5-羟赖氨酸
Hyp	4-羟脯氨酸
IDL	中密度脂蛋白
IF	启动因子
IgG	免疫球蛋白 G
IMP	次黄核苷一磷酸
IP_3	肌醇-1,4,5-三磷酸
IPTG	异丙基硫代半乳糖苷
IS	插入序列
ISP	铁-硫蛋白
kb	千碱基对
kD	千道尔顿
K_M	米氏常数
LDH	乳酸脱氢酶
LDL	低密度脂蛋白
LHC	集光复合体
Man	甘露糖
Mb	肌球蛋白
mRNA	信使 RNA
MurNAc	N-乙酸胞壁酸
NAD^+	尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸氧化型
NADH	尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸还原型
$NADP^+$	尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化型
NADPH	尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸还原型
NAG	N-乙酰葡萄糖胺
NAM	N-乙酰胞壁酸
NANA	N-乙酰神经氨酸(唾液酸)
NDP	核苷二磷酸
NER	核苷酸切除修复
NeuNAc	N-乙酰神经氨酸
NMN	尼克酰胺单核苷酸
NMR	核磁共振
nt	核苷酸
NTP	核苷三磷酸
OEC	产氧中心
OMP	乳清酸核苷单磷酸
ORF	可读框
P or p	磷酸
PAGE	聚丙烯酰胺凝胶电泳
PBG	胆色素原
PC	质体兰素
PCR	聚合酶链反应
PDI	蛋白质二硫键异构酶
PE	磷脂酰乙醇胺
PEP	磷酸烯酸式丙酮酸
PEPCK	PEP 羧基酸酶
PFGE	脉冲场凝胶电泳
PFK	磷酸果糖激酶
2PG	2-磷酸甘油酸′
3PG	3-磷酸甘油酸
PGI	磷酸葡萄糖异构酶
PGK	磷酸甘油酸激酶
PGM	磷酸甘油酸变位酶
Pheo	褐藻素
P_i	正磷酸
PIC	前启动复合物
PIP_2	磷脂酰肌醇-4,5-二磷酸
PK	丙酮酸激酶
PKU	苯丙酮尿症
PLP	5′-磷酸吡哆醛
pmf	质子动力
PNP	嘌呤核苷酸磷酸化酶
Pol	DNA 聚合物
PP_i	焦磷酸
PRPP	5-磷酸核糖-焦磷酸
PS	光合系统
Q	泛醌键(CoQ)质体醌
QH_2	泛醌醇或质体醌醇
r	核糖
R5P	核糖-5-磷酸
RER	粗糙内质网
RF	释放因子
RFLP	限制性片段长度多态性
RIA	放射免疫测定法
RNA	核糖核酸
rRNA	核糖体 RNA
RT	反转录酶
RTK	受体酪氨酸激酶
Ru5P	核酮糖-5-磷酸
RuBP	核酮糖-1,5-二磷酸
S	沉降系数单位
S7P	景天庚酮糖-7-磷酸
SAM	S-腺苷甲硫氨酸
SCID	严重联合免疫缺损病

SDS	十二烷基硫酸钠
snRNA	小核 RNA
snRNP	核小核糖核蛋白
SOD	超氧化物歧化酶
SRP	信号识别颗粒
SSB	单链结合蛋白
STAT	信号转导物和转录激活因子
T	胸腺嘧啶
TAF	TBP 相关因子
TBP	TATA 框结合蛋白
TCA	三羧酸
THF	四氢叶酸
TIM	磷酸核糖异构酶
TNBS	三硝基苯磺酸
TPP	焦磷酸硫胺素
tRNA	转移 DNA
TTP	胸苷三磷酸
U	尿嘧啶
UDP	尿苷二磷酸
UDPG	尿苷二磷酸葡萄糖
UMP	尿苷一磷酸
UTP	尿苷三磷酸
UV	紫外线
VLDL	超低密度脂蛋白
V_{max}	最大速度
XMP	黄嘌呤核苷单磷
Xu5P	木酮糖-5-磷酸
YAC	酵母人工染色体
YADH	酵母醇脱氢酶

索　　引

西文在前，按字母顺序排序；中文在后，按汉语拼音排序。页码为讨论该词条的出处，是原版英文书的页码，标在正文切口的空白处。页码数字后的“F”表示“图”，“T”表示“表”。

Hoogsteen 碱基对 Hoogsteen base pair 740F